

10/540156
PCT/JP2004/002725
04. 3. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 7 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 6 2 4 5 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 6 2 4 5 4]

REC'D 22 APR 2004

WIPO

PCT

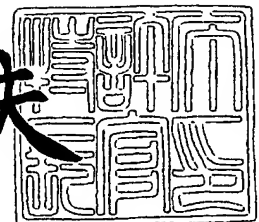
出 願 人 株式会社マングム
Applicant(s):

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 2 8 8 4 4

【書類名】 特許願
【整理番号】 MA-15-001
【提出日】 平成15年 3月 7日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 7/13
C12N 9/00

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区本山北町 4-7-54

【氏名】 辻野 義雄

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区住吉本町 2-6-12

【氏名】 圓藤 勝義

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区向洋町中 5-5-531-722

【氏名】 ハサン アブル カイル ムハマド カムルル

【特許出願人】

【識別番号】 390011442

【氏名又は名称】 株式会社マングム

【代理人】

【識別番号】 100095832

【弁理士】

【氏名又は名称】 細田 芳徳

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050739

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0011742

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 中性フェノールオキシダーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の特性：

(1) 分子量：約 72 kDa (ゲル濾過法による)

(2) 至適 pH：5.5～7.0

(3) 基質特異性

① N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン、オルト-アミノフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、1, 3-ジヒドロキシナフトール及び4-ヒドロキシインドールそれぞれの酸化による発色反応を pH 6.5 付近で触媒する

② リグニンアルカリ抽出物の酸化的重合反応を触媒する
を有する中性フェノールオキシダーゼ。

【請求項2】 以下の特性：

(4) pH安定性：pH 8.0～9.0において、25℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(5) 至適温度：30～50℃

(6) 熱安定性：

① 0℃～30℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

② 0℃～30℃において、pH 8.5で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

(7) 等電点：約 7.4

又は、以下の特性：

(4') pH安定性：pH 7.0～10.0において、25℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも75%の相対残存活性を維持する

(5') 至適温度：30～60℃

(6') 熱安定性:

① 0℃～50℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

② 0℃～50℃において、pH 8.5で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(7') 等電点: 約6.8

をさらに有する、請求項1記載の中性フェノールオキシダーゼ。

【請求項3】 フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌が生産する、請求項1又は2記載の中性フェノールオキシダーゼ。

【請求項4】 フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌が、エノキタケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕に属する担子菌である、請求項1～3いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼ。

【請求項5】 エノキタケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕に属する担子菌が、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕 IFO30601株である、請求項1～4いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼ。

【請求項6】 フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を、pH 6.0～12.0で培養することを特徴とする、中性フェノールオキシダーゼの生産方法。

【請求項7】 中性フェノールオキシダーゼが、請求項1又は2記載の中性フェノールオキシダーゼである、請求項6記載の生産方法。

【請求項8】 請求項1～5いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼに対する抗体。

【請求項9】 請求項1～5いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼを含有してなる染色用組成物。

【請求項10】 染料をさらに含有してなる、請求項9記載の染色用組成物

【請求項 11】 請求項 1～5 いずれか 1 項に記載の中性フェノールオキシダーゼの存在下に、染色対象物と染料とを接触させて、該染色対象物を染色することを特徴とする、染色方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、種々の基質に対して、基質による至適 pH の変動が小さく、中性付近で高い酵素活性を有する中性フェノールオキシダーゼ及びその生産方法ならびに該中性フェノールオキシダーゼに対する抗体に関する。より詳しくは、繊維や毛髪の色等々に有用な中性フェノールオキシダーゼ及びその生産方法、ならびに該中性フェノールオキシダーゼを特異的に認識する抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】

フェノール化合物、ポリフェノール化合物等の種々の基質に対して酸化作用を有する酸化酵素は、主に、ペルオキシダーゼとフェノールオキシダーゼとの 2 つのグループに分類される。

【0003】

前記ペルオキシダーゼは、種々の基質の酸化を触媒し、共通の基質として、反応系中に過酸化水素の存在を必要とする。一方、フェノールオキシダーゼは、種々の基質の酸化を触媒し、共通の基質として、分子状酸素の存在を必要とする。

【0004】

したがって、既知の酸化酵素類の中でも、前記フェノールオキシダーゼは、大気中の酸素の存在下で種々の基質の酸化を触媒することができるため、酸素存在下で中間体としてのラジカル種の生成に起因する発色、脱色、重合、分解等の多様な化学反応に適している。

【0005】

それゆえ、臨床分析、バイオセンサー、パルプ及び繊維の漂白、合成板の製造、木質の改善、フェノール樹脂の製造、人工漆塗料の製造、接着剤の製造、有機

化合物の合成、染色及び抜染、洗濯時の色移り防止、廃液中のフェノール及びアニリン化合物の除去、毒性化合物の解毒、内分泌攪乱物質の分解、ジュースの混濁防止、食品の苦渋味の除去、家畜飼料の体内消化の促進、悪臭の抑制、化石燃料の脱硫、有害環境物質の分解処理等の多方面へのフェノールオキシダーゼの幅広い応用が期待されている（非特許文献1等）。

【0006】

また、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、2, 2'-アジノービス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（以下、ABTSと略す）、1-ニトロソ-2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸（以下、NNSと略す）等のメディエーターを用いて反応を行なうことにより、従来触媒されにくかった（あるいは、触媒されなかった）反応をも効率よく行なうこともできる（特許文献1等）。

【0007】

例えば、メディエーターとしてフェノチアジン-10-プロピオン酸を用いた場合、フェノールオキシダーゼによるインジゴの分解反応を効率よく行なうことができるが開示されている（非特許文献1）。また、フェノールオキシダーゼ含有物と、フェノールオキシダーゼ・メディエーターを含有する組成物とを併用することにより、ダイオキシンの分解を行なうことができることが開示されている（特許文献2）。

【0008】

多くの潜在的な工業的利用については、反応効率等の観点から、反応pHは中性及びアルカリ性領域が適しており、特に中性での利用は、環境や人体等に対する影響が少ない温和な条件下での反応が可能である等の、数多くの利点を有する。

【0009】

前記フェノールオキシダーゼとしては、ラッカーゼ、チロシナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ（カテコールオキシダーゼ）アスコルビン酸オキシダーゼ、又はポリルビンオキシダーゼ等が挙げられる。

【0010】

ただし、チロシナーゼは、モノフェノール化合物、及び、オルトージフェノール化合物の直接的な酸化（発色）を触媒するが、パラージフェノール化合物及びパラージアミン（フェニレンジアミン）化合物の酸化を触媒しないという特徴がある（非特許文献2）。

【0011】

前記フェノールオキシダーゼは、従来から種々の植物、細菌類及び真菌類等に見出されている。例えば、植物では、ウルシ科（*Anacardiaceae*）の分泌性導管、桃類、栗類、マキ科（*Podocarpaceae*）等において、前記フェノールオキシダーゼが見出されている。真菌類では、不完全菌亜門（*Deuteromycotina*）に属する、アスペルギルス（*Aspergillus*）、ボトリティス（*Botrytis*）、ミロセシウム（*Myrothecium*）、ペニシリウム（*Penicillium*）、ペスタロチア（*Pestalotia*）、リゾクトニア（*Rhizoctonia*）等；担子菌亜門（*Basidiomycotina*）に属する、プロイロータス（*Pleurotus*）、レンティナス（*Lentinus*）、ポリポラス（*Polyporus*）、トラメテス（*Trametes*）、コリオラス（*Coriolus*）等；子囊菌亜門（*Ascomycotina*）に属するポドスポラ（*Podospora*）、ノイロスポラ（*Neurospora*）、モノシリウム（*Monocillium*）等において、前記フェノールオキシダーゼが見出されている。細菌では、バチルス（*Bacillus*）、アゾスピリウム（*Azospirillum*）、ストレプトミセス（*Streptomyces*）、アエロバクタ（*Aerobacter*）等において、前記フェノールオキシダーゼが見出されている（非特許文献3等）。

【0012】

これらの中で、担子菌（*Basidiomycetes*）（木材腐朽菌類等、中でも白色腐朽菌等）であるキノコでは、例えば、スエヒロタケ（*Schizophyllum commune*）、カワラタケ（*Coriolus versicolor*）、ヒイロタケ（*Pycnoporus coccineus*）、ヒラタケ（*Pleurotus octreatus*）、ベッコウタケ（*Fomitella*

l a f r a x i n e a) 等において、前記フェノールオキシダーゼが見出されている (非特許文献 4 等)。

【0013】

しかし、フェノールオキシダーゼの多くは、種々の基質に対する酵素活性の至適 pH を酸性側に有し、使用用途が限定されるという欠点がある。また、中性やアルカリ性に至適 pH を有するフェノールオキシダーゼでも、用いる基質によって至適 pH が大きく変動し、中性付近で種々の基質に対して効率よく作用しないという欠点がある。

【0014】

また、イルベックス・ラクテウス (*I r p e x l a c t e u s*)、オウリキユラリア・ポリトリカ (*A u r i c u l a r i a p o l y t r i c h a*)、ガノデルム・ルシダム (*G a n o d e r m l u c i d u m*)、コプリナス・ミカセウス (*C o p r i n u s m i c a c e u s*)、ダエダレオブシス・スチラシナ (*D a e d a l e o p s i s s t y r a c i n a*) 及びフラムリナ・ベルティペス (*F l a m m u l i n a v e l t i p e s*) には、ラッカーゼが見出されており、なかでも、イルベックス・ラクテウス (*I r p e x l a c t e u s*) のラッカーゼは、pH 6.0 付近の反応条件下に、4-アミノアンチピリンとフェノールとを酸化縮合して発色する活性を示すことが見出されている (特許文献 3)。

【0015】

しかしながら、前記ラッカーゼは、酸性条件で培養することにより見出される酵素である。

【0016】

【特許文献 1】 国際公開第 96/16165 号パンフレット

【特許文献 2】 特許公開 2001-037465 号公報

【特許文献 3】 特開昭 60-156385 号公報

【非特許文献 1】 平成 13 年度福井大学地域共同研究センター高度技術研修資料集、第 55 項、

【非特許文献 2】 メイヤー (M a y e r) 及びハレル (H a r e l)

, *Phytochem.* 18, 193-215, 1979

【非特許文献3】 ヨシダ (Yoshida), *J. Chem. Soc.* 43, 472, 1883

【非特許文献4】 ウラー (Ullah) 及びエバンス (Evans), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 230-234, 2000

【0017】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、繊維や毛髪の色を可能にし、さらには、環境、人体等への影響を低減させることができる手段を提供することを目的とする。本発明は、種々の化合物、特に、フェノール化合物、アミノフェノール化合物及びジアミン化合物に対して中性付近に至適 pH を有すること、中性 pH から弱アルカリ性 pH までの広範囲で高い安定性を示すこと、基質による至適 pH の変動が小さいこと等の特性を有するフェノールオキシダーゼ、具体的には、中性フェノールオキシダーゼを提供することを目的とする。また、本発明は、前記中性フェノールオキシダーゼを、効率よく、簡便に、安価に、かつ大量に得ることができる、生産方法を提供することを目的とする。さらに、本発明は、前記中性フェノールオキシダーゼの回収、精製等を可能にする抗体を提供することを目的とする。また、本発明は、種々の染料、具体的には、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミン化合物等による染色が可能な染色方法及び取扱いが簡便である染色用組成物を提供することを目的とする。

【0018】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明の要旨は、

〔1〕 以下の特性：

(1) 分子量：約 72 kDa (ゲル濾過法による)

(2) 至適 pH：5.5～7.0

(3) 基質特異性

① N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン、オルト-アミノフェノール

ル、2, 6-ジメトキシフェノール、1, 3-ジヒドロキシナフトール及び4-ヒドロキシインドールそれぞれの酸化による発色反応をpH 6.5付近で触媒する

② リグニンアルカリ抽出物の酸化的重合反応を触媒する

を有する中性フェノールオキシダーゼ、

〔2〕 以下の特性:

(4) pH安定性: pH 8.0~9.0において、25℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(5) 至適温度: 30~50℃

(6) 熱安定性:

① 0℃~30℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

② 0℃~30℃において、pH 8.5で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

(7) 等電点: 約7.4

又は、以下の特性:

(4') pH安定性: pH 7.0~10.0において、25℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも75%の相対残存活性を維持する

(5') 至適温度: 30~60℃

(6') 熱安定性:

① 0℃~50℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

② 0℃~50℃において、pH 8.5で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(7') 等電点: 約6.8

をさらに有する、前記〔1〕記載の中性フェノールオキシダーゼ、

〔3〕 フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌が生産する、前記〔1〕又は〔2〕記載の中性フェノールオキシダーゼ、

〔4〕 フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌が、エノキタケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕に属する担子菌である、前記〔1〕～〔3〕いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼ、

〔5〕 エノキタケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕に属する担子菌が、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕 IFO30601株である、前記〔1〕～〔4〕いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼ、

〔6〕 フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を、pH 6.0～12.0で培養することを特徴とする、中性フェノールオキシダーゼの生産方法、

〔7〕 中性フェノールオキシダーゼが、前記〔1〕又は〔2〕記載の中性フェノールオキシダーゼである、前記〔6〕記載の生産方法、

〔8〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼに対する抗体、

〔9〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼを含有してなる染色用組成物、

〔10〕 染料をさらに含有してなる、前記〔9〕記載の染色用組成物、並びに

〔11〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼの存在下に、染色対象物と染料とを接触させて、該染色対象物を染色すること

を特徴とする、染色方法、

に関する。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、以下の特性：

(1) 分子量：約72 kDa (ゲル濾過法による)

(2) 至適 pH: 5.5 ~ 7.0

(3) 基質特異性

① N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン、オルト-アミノフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、1, 3-ジヒドロキシナフトール及び4-ヒドロキシインドールそれぞれの酸化による発色反応を pH 6.5 付近で触媒する

② リグニンアルカリ抽出物の酸化的重合反応を触媒する
を有するフェノールオキシダーゼである。

【0020】

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、基質の種類による至適 pH の変動が小さいという優れた性質を有する。したがって、本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、多基質に対し、実質的に同一の反応 pH 条件での反応を行なうことができるという優れた効果を発揮する。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、複数の化合物を基質として用いる場合でも、反応 pH 条件の変更の工程を簡略化させることができるという優れた効果を発揮する。したがって、本発明の中性フェノールオキシダーゼを、繊維や毛髪の染色等に用いることにより、反応 pH 条件の変更の工程を簡略化することができる。

【0021】

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、より具体的には、前記(1) ~ (3)の特性に加え、以下の特性:

(4) pH 安定性: pH 8.0 ~ 9.0 において、25℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(5) 至適温度: 30 ~ 50℃

(6) 熱安定性:

① 0℃ ~ 30℃において、pH 7.0 で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

② 0℃ ~ 30℃において、pH 8.5 で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持

する

(7) 等電点: 約 7.4

又は、以下の特性:

(4') pH安定性: pH 7.0~10.0において、25℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも75%の相対残存活性を維持する

(5') 至適温度: 30~60℃

(6') 熱安定性:

① 0℃~50℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

② 0℃~50℃において、pH 8.5で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(7') 等電点: 約 6.8

をさらに有する中性フェノールオキシダーゼである。なお、本明細書においては、前記(1)~(3)及び(4)~(7)の特性を有する中性フェノールオキシダーゼを、「中性フェノールオキシダーゼI」といい、前記(1)~(3)及び(4')~(7')の特性を有する中性フェノールオキシダーゼを、「中性フェノールオキシダーゼII」という。

【0022】

本明細書において、「フェノールオキシダーゼ」とは、酸素存在下で、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミン化合物、複素環化合物等を基質として、触媒的に直接酸化する酸化酵素をいう。より具体的には、前記「フェノールオキシダーゼ」とは、パラフェニレンジアミン、2,6-ジメトキシフェノール、カテコール、ABTS、シリングアルダジンを直接酸化するが、L-チロシンを直接酸化しないフェノールオキシダーゼをいう。

【0023】

また、本明細書において、「中性フェノールオキシダーゼ」とは、至適pH 5.0~8.0、好ましくは、至適pH: 5.5~7.0のフェノールオキシダー

ゼをいう。

【0024】

前記フェノール化合物としては、例えば、2-メトキシフェノール、2,6-ジメトキシフェノール、カテコール、ピロガロール、没食子酸、没食子酸プロピル、1-ナフトール、カテキン等が挙げられる。また、前記アミノフェノール化合物としては、例えば、オルト-アミノフェノール、パラ-アミノフェノール等が挙げられる。さらに、前記ジアミン化合物としては、例えば、オルト-フェニレンジアミン、パラ-フェニレンジアミン等が挙げられる。前記複素環化合物としては、4-ヒドロキシインドール、5-ヒドロキシインドール等が挙げられる。

【0025】

本発明の中性フェノールオキシダーゼの酵素活性は、基質に対する酸化活性、染料に対する脱色活性等を測定することにより評価されうる。

【0026】

本発明の中性フェノールオキシダーゼによる基質に対する酸化活性は、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミン化合物等を水素供与体として用いて酸素分子を還元する、基質の直接的な酸化反応を測定することによって求められうる。水素供与体としては、例えば、2,6-ジメトキシフェノール、オルト-アミノフェノール、パラ-フェニレンジアミン等を挙げることができる。前記酸化活性は、例えば、シリungalダジン (530 nm)、2,6-ジメトキシフェノール及びパラ-フェニレンジアミン (470 nm)、オルト-アミノフェノール (420 nm) における吸光度の変化により測定される。

【0027】

具体的には、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.896 ml に、0.05 M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1 ml を添加し、基質溶液を得る。この基質溶液と中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の酵素溶液 0.004 ml とを混合して、2,6-ジメトキシフェノールの酸化反応を開始させる。ついで、この2,6-ジメトキシフェノールの酸化反応を、470 nm における吸光度の変化により測定するこ

とによって、前記酸化活性を求められうる。前記酸化活性は、各基質に応じた波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位（U：ユニット）として定義される。

【0028】

また、本発明の中性フェノールオキシダーゼによる染料に対する脱色活性は、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の存在下、染料の吸収スペクトルの極大値（ λ_{\max} ）の減少を測定することによって求められうる。前記染料としては、例えば、アシッドバイオレット 17、エバンスブルー、アシッドブルー 80 等を挙げることができる。染料の脱色活性は、例えば、アシッドバイオレット 17（550 nm）、エバンスブルー及びアシッドブルー 80（630 nm）における吸光度の減少により測定される。

【0029】

具体的には、アシッドバイオレット 17 を用いる場合、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II を含む酵素溶液 0.8 ml に、1.0 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）0.1 ml を添加し、ついで、0.2 mg/ml のアシッドバイオレット 17 水溶液 0.1 ml を混合して、得られた混合液について、550 nm における吸光度の減少を測定することによって、脱色活性を求められうる。なお、前記脱色反応に関する酵素活性は、各染料に応じた波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位（U：ユニット）として定義される。

【0030】

本発明の中性フェノールオキシダーゼ、すなわち、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、いずれも約 72 kDa の分子量（ゲル濾過法により算出）を有する。本明細書において、前記分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いたゲル濾過法により算出された値をいう。前記分子量は、例えば、目的のタンパク質を、ゲル濾過クロマトグラフィーに供して、一定流速の下での溶出液量を測定し、得られた測定値と、分子量が既知である分子量マーカーを用いて作成された検量線とを比較することにより算出されうる。

【0031】

本発明の中性フェノールオキシダーゼ、すなわち、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、いずれも pH 5.5～7.0 の範囲で、高い酵素活性を有し、かかる pH の範囲において、最大活性に対して、少なくとも 50% の相対活性を示す。本発明の中性フェノールオキシダーゼは、前記 pH 範囲で優れた酵素活性を示すため、水ベースの反応溶液を用いることができ、効率よく酵素反応を行なうために特別な pH 調整が必要とされないという優れた効果を発揮する。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼは、水ベースの反応溶液を用いることができ、具体的には、例えば、特別な pH 調整を行っていない基質と酵素との水溶液でも効率よく反応を行なうことができるため、反応溶液による人体、環境への影響が少ないという優れた効果を発揮する。さらに、本発明の中性フェノールオキシダーゼは、種々の基質、特に、フェノール化合物、アミノフェノール化合物及びジアミン化合物のいずれに対しても至適 pH に大きな変動がなく、中性付近の pH で効率よく基質を酸化させることができる。

【0032】

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、具体的には、フェノール化合物、アミノフェノール化合物及びジアミン化合物を基質とする酸化反応において、中性付近、具体的には、pH 5.0～8.0、好ましくは、pH 5.5～7.0 に至適 pH を有する。

【0033】

より具体的には、中性フェノールオキシダーゼ I は、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適 pH は、約 5.0～約 7.0、より至適な範囲として、約 5.5～約 7.0 であり、オルト-アミノフェノールを基質として用いた場合、至適 pH は、約 5.5～約 7.0、より至適な範囲として、約 5.5～約 6.5 であり、パラ-フェニレンジアミンを基質として用いた場合、至適 pH は、約 5.5～約 7.0、より至適な範囲として、約 5.5～約 6.5 であり、さらに至適な範囲として、約 5.5～約 6.0 であり、シリンガルダジンを基質として用いた場合、至適 pH は、約 5.5～約 7.0、より至適な範囲として、約 5.5～約 6.5、特に、約 6.5 である。一方、中性フェノールオキシダーゼ II は、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適

pHは、約5.0～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約7.0、さらに至適な範囲として、約5.5～約6.0であり、オルトアミノフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約6.0であり、パラフェニレンジアミンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約6.5、さらに至適な範囲として、約5.5～約6.0であり、シリングアルダジンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約6.5である。

【0034】

本発明の中性フェノールオキシダーゼ、すなわち、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIは、いずれも、

① N, N-ジメチル-パラフェニレンジアミン、オルトアミノフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、1, 3-ジヒドロキシナフトール及び4-ヒドロキシインドールそれぞれの酸化による発色反応をpH 6.5付近で触媒する

② リグニンアルカリ抽出物の酸化的重合反応を触媒するという基質特異性を示す。具体的には、本発明の中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIは、いずれも、中性（pH 6.5）条件下で、下記基質特異性：

1) オルトフェニレンジアミン、パラフェニレンジアミン、N, N-ジメチル-パラフェニレンジアミン、トルエン-3, 4-ジアミン、パラアミノジフェニルアミン、2-クロロ-1, 4-フェニレンジアミン、2, 5-ジアミノトルエン等のジアミン化合物の酸化反応を触媒し、特に、N, N-ジメチル-パラフェニレンジアミンの酸化反応を強く触媒する

2) オルトアミノフェノール、パラアミノフェノール、5-アミノ-2-メチルフェノール等のアミノフェノール化合物の酸化反応を触媒し、特に、オルトアミノフェノールの酸化反応を強く触媒する

3) 2-メトキシフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、カテコール、プロトカテキ酸等のフェノール化合物の酸化反応を触媒し、特に、2, 6-ジメ

トキシフェノールの酸化反応を強く触媒する

4) 1-ナフトール、1, 3-ジヒドロキシナフトール、1, 5-ジヒドロキシナフトール等のナフトール化合物の酸化反応を触媒し、特に、1, 3-ジヒドロキシナフタレンの酸化反応を強く触媒する

5) 4-ヒドロキシインドール、5-ヒドロキシインドール等のインドール化合物の酸化反応を触媒する

6) カテキン（緑茶抽出物）、リグニンアルカリ抽出物（稲由来）、リグニンアルカリ抽出物（針葉樹由来）等の化合物（抽出物）の酸化反応を触媒する

を示す。なお、前記基質特異性に関して、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I は、リグニンアルカリ抽出物（針葉樹由来）を基質とした場合、中性（pH 6.5）条件及びアルカリ性（pH 9.0）条件の両方で同等の強い触媒活性がみられ、その他のジアミン化合物、アミノフェノール化合物、フェノール化合物、ナフトール化合物、インドール化合物、カテキン（緑茶抽出物）及びリグニンアルカリ抽出物（稲由来）のそれぞれを基質とした場合、中性（pH 6.5）条件下での比活性のほうが、アルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性よりも高いという特性を有する。一方、本発明の中性フェノールオキシダーゼ II は、リグニンアルカリ抽出物（針葉樹）を基質とした場合以外は、様々な基質において、中性（pH 6.5）条件下での比活性のほうが、アルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性よりも高いという特性を有する。

【0035】

また、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、いずれも、フェノールオキシダーゼ・メディエーターである ABTS、NNS を基質として酸化する。

【0036】

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、中性 pH から弱アルカリ性 pH までの広範囲で高い pH 安定性を示すという優れた性質を有する。具体的には、中性フェノールオキシダーゼ I は、pH 7.0～10.0 において、25℃で20時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも25%の相対残存活性、好ましくは、pH 8.0～9.0 において、25℃で

20時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を維持する。一方、中性フェノールオキシダーゼIIは、pH4.0~10.0において、25℃で20時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも50%の相対残存活性、pH7.0~10.0において、25℃で20時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも75%の相対残存活性を維持する。

【0037】

本発明の中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIは、それぞれ、30~50℃の範囲及び30~60℃の範囲で、高い酵素活性を示す。すなわち、本発明の中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIは、前記温度範囲において優れた酵素活性を有するため、特別な温度条件に調整することなく、日常の生活温度（室温、水温、体温、気温等）で高い酵素活性を示す。したがって、本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、染色、廃液処理、高分子化合物の合成等を簡便に行なうことができる。具体的には、本発明の中性フェノールオキシダーゼIは、

① 0℃~40℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも50%の相対残存活性を維持し、好ましくは、0℃~30℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

② 0℃~40℃において、pH8.5で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも60%の相対残存活性を維持し、好ましくは、0℃~30℃において、pH8.5で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

という熱安定性を示す。一方、本発明の中性フェノールオキシダーゼIIは、

① 0℃~60℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも15%の相対残存活性を維持し

、0℃～50℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

② 0℃～60℃において、pH 8.5で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも0%の相対残存活性を維持し、好ましくは、0℃～50℃において、pH 8.5で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

という熱安定性を示す。

【0038】

本発明の中性フェノールオキシダーゼ、すなわち、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIは、具体的には、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌により生産される。前記フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌としては、具体的には、エノキタケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕に属する担子菌が挙げられ、より具体的には、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕IFO30601株が挙げられる。本発明の中性フェノールオキシダーゼ、すなわち、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIは、特に、前記エノキダケより得ることができるため、供給源の入手が容易であり、取扱いの容易性にも優れる。

【0039】

本発明の中性フェノールオキシダーゼ、すなわち、中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIは、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を培養することによって生産することができる。かかる中性フェノールオキシダーゼの生産方法も本発明に含まれる。

【0040】

本発明の生産方法は、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を、pH 6.0～12.0で培養することを1つの特徴とする。

【0041】

本発明の生産方法においては、担子菌をpH 6.0～12.0で培養するため

、本発明の中性フェノールオキシダーゼ、すなわち、中性フェノールオキシダーゼ I 及びフェノールオキシダーゼ II が誘導され、驚くべく効率よくかつ高い収率で本発明の中性フェノールオキシダーゼをえることができるという優れた効果を発揮する。

【0042】

本発明の生産方法としては、具体的には、1) フラムリナ (Flammulina) 属に属する担子菌を、pH 6.0～12.0 で培養する工程、及び
2) 前記工程 1) で得られた培養物の培養液上清又は該培養物より得られた抽出物から中性フェノールオキシダーゼを分離する工程、
を含む方法が挙げられる。

【0043】

前記培地の pH は、フラムリナ (Flammulina) 属に属する担子菌を十分に生育させ、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II を生産するに適した pH であればよく、pH 6.0～12.0、好ましくは、pH 7.0～11.0、更に好ましくは pH 8.0～10.0 に調製し、滅菌して使用することが望ましい。

【0044】

なお、本発明においては、中性フェノールオキシダーゼの生産量を向上させる観点から、前記工程 1) において、

- ① 担子菌の菌糸体を増やすための培養工程、及び
- ② 前記培養工程①で得られた菌糸体中において、酵素の発現を誘導して生産量を増やすための培養工程

を行なってもよい。この場合、前記培養工程①において、菌糸体の増殖に適した pH、具体的には、例えば、pH 2.0～13.0、好ましくは、pH 4.0～10.0、特に好ましくは、pH 5.2 での培養を行ない、ついで、前記培養工程②において、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II を生産するに適した pH、具体的には、pH 6.0～12.0、好ましくは、pH 7.0～11.0、更に好ましくは pH 8.0～10.0 での培養を行なってもよい。また、前記培養工程①においては、菌糸体の培養量をスケ

ールアップする操作を適宜行なってもよい。

【0045】

前記工程1)において、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌は、液体培養、又は固体培養のいずれにおいても培養することができる。

【0046】

フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌の培養には、この菌が生育可能な、通常の液体培地又は固体培地のいずれを用いてもよい。

【0047】

なお、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を液体培養する場合は、通気培養又は振盪培養が望ましい。

【0048】

炭素源としては、例えば、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌が同化しうるものであれば何でもよく、グルコース、ショ糖、糖蜜、でんぷん等の糖類、ふすま、みかんパルプ等が挙げられ、前記炭素源は、単独で、又は、2種類以上を組み合わせる用いることができる。また、窒素源としては、例えば、おから、ペプトン、トリプトン、カザミノ酸、酵母エキス、麦芽エキス、脱脂大豆粉、コーンステープリカー、尿素等の有機窒素源のほか、硝酸カリウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素等も挙げられ、単独で、又は、2種類以上を組み合わせる用いることができる。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II を生産するための培地には、必要に応じて、リン酸塩、硫酸マグネシウム、炭酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、カリウム、カルシウム、鉄、銅、亜鉛、マンガン、コバルト等の無機塩類、ビタミン類等を添加してもよい。これらの培地中における前記炭素源、窒素源等の濃度は、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を十分に生育させ、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II を生産するに適した濃度であればよく、炭素源は 0.1~20 重量%、好ましくは 1~10 重量%、窒素源は 0.1~10 重量%、好ましくは 1~5 重量%である事が望ましい。

【0049】

培養温度は、糸状菌が生育する温度であればよく、実用上、10～40℃、好ましくは20～35℃であることが望ましい。

【0050】

培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通気培養の場合は、通常2～10日間が望ましい。また、前記培養時間は、培養液の酵素活性値が最大になることを指標として、設定することもできる。

【0051】

前記工程1)の具体例としては、例えば、

ー フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を、液体培養用培地1〔組成: 2.4重量% ポテトデキストロースブロス〔デイフィコ (*Difco*) 社製〕、残部 水 (pH 5.2); 121℃で15分間滅菌したもの〕に播種し、25℃で7日間、往復振盪培養 (150往復/分) を行ない、得られた培養液全量を、2L容の三角フラスコ中500mlの前記液体培養用培地1に添加し、25℃で3週間、往復振盪培養 (100往復/分) を行なう工程 (前記培養工程①に対応)、及び

ー 得られたペレット状の菌糸体を静置沈殿させ、上清の培養液を除去し、残部の菌糸体に、液体培養用培地2〔組成: 1.0重量% グルコース、0.1重量% 酵母エキス、0.14重量% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.36重量% K_2HPO_4 、0.02重量% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.10重量% ミネラル混合液 (組成: 1.0重量% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.0重量% ZnCl_2 、0.7重量% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.5重量% $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5重量% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、pH 9.2; 121℃で15分間滅菌したもの〕 500mlを添加し、さらに25℃で3日間培養する工程 (前記培養工程②に対応)

を行なうこと等が挙げられる。

【0052】

ついで、前記工程1)で得られた培養物の培養液上清又は該培養物より得られた抽出物から中性フェノールオキシダーゼを分離する工程〔工程2)〕を行なう。

【0053】

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、菌体外に分泌生産され、培養液中に蓄積される。したがって、前記工程2)において、前記工程1)で得られた培養物から、菌体等の不溶物を遠心分離、濾紙又は濾布等による濾過等により除去し、本発明の中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIを包含する培養上清を得ることができる。

【0054】

また、前記工程2)において、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌の菌床、又は栽培後の廃菌床から抽出し、本発明の中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIを包含する抽出物を得ることができる。

【0055】

得られた培養上清又は抽出物を、脱色、濃縮、塩析（例えば、硫酸分画）、透析、各種クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等の一般に用いられるタンパク質の精製法に供することにより、中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIを分離精製することができる。

【0056】

例えば、得られた培養上清又は抽出物を凍結乾燥し、再度溶解させ、得られた産物を濾過することによって不溶物を取り除き、イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーに順次供試することにより、精製され、かつ高い比活性を有する本発明の中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIを含有する画分が得られる。

【0057】

本発明において、中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIの精製度は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (*native-PAGE*)、*SDS*-ポリアクリルアミド電気泳動 (*SDS-PAGE*) 及びこれらの電気泳動後のゲルを用いた活性染色により評価されうる。

【0058】

本発明において、前記 *native-PAGE* 及び *SDS-PAGE* の際、共

に、泳動用サンプルを加熱せずに電気泳動を行なう。

【0059】

n a t i v e-PAGEを行なった後に、パラフェニレンジアミンを基質として用いる活性染色を行なう場合、例えば、n a t i v e-PAGE後に得られたゲルを、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で20分間振盪攪拌し、その後、0.001M パラフェニレンジアミンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で5分間振盪攪拌することによって行なえばよい。

【0060】

n a t i v e-PAGEを行なった後、クーマシーブリリアントブルーによりタンパク質の染色を行なう場合、例えば、0.5gのクーマシーブリリアントブルー R250を、500mlのメタノールと100mlの酢酸との混合溶液 (全600ml) に溶解し、蒸留イオン交換水で全量を1000mlに調整して得られた染色用溶液に、電気泳動後のゲルを浸すことにより染色を行なえばよい。その後、250mlのメタノールと70mlの酢酸との混合溶液 (320ml) を蒸留イオン交換水で全量を1000mlに調整して得られた脱色用溶液で、脱色を行なう。

【0061】

SDS-PAGEを行なった後、パラフェニレンジアミンにより活性染色を行なう場合、例えば、SDS-PAGE後に得られたゲルを、2.5w/v% Triton X-100を含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で60分間振盪攪拌し、その後、0.001M パラフェニレンジアミンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中でゲルを5分間振盪攪拌することによって行なえばよい。

【0062】

SDS-PAGEを行なった後、クーマシーブリリアントブルーによるタンパク質の染色を行なう場合、例えば、0.5gのクーマシーブリリアントブルー R250を、500mlのメタノールと100mlの酢酸との混合溶液 (全600ml) に溶解し、蒸留イオン交換水で全量を1000mlに調整して得られた

染色用溶液に、電気泳動後のゲルを浸すことにより染色を行なえばよい。その後、250mlのメタノールと70mlの酢酸との混合溶液(320ml)を蒸留イオン交換水で全量を1000mlに調整して得られた脱色用溶液で、脱色を行なう。

【0063】

本発明の中性フェノールオキシダーゼ、すなわち、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIは、SDS-PAGE後のクマシーブリアントブルー染色による純度の評価において、それぞれ実質的に均一な精製度を示すため、本発明により、該中性フェノールオキシダーゼに対する抗体も提供される。

【0064】

本発明の抗体は、本発明の中性フェノールオキシダーゼ、すなわち、中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIに特異的に結合する能力を有するものであればよく、ポリクローナル抗体であってもよく、モノクローナル抗体であってもよい。

【0065】

本発明の抗体は、本発明の中性フェノールオキシダーゼ、すなわち、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIのそれぞれについて、例えば、1992年、ジョン・ワイリー&サンズ社(John Wiley & Sons, Inc.)発行、ジョン・E・コリガン(John E. Coligan)編集、カレント・プロトコルズ・イン・イムノロジー(Current Protocols in Immunology)等に記載の方法にしたがい、ウサギ、マウス等の動物を免疫し、慣用の方法で精製することにより、容易に作製されうる。

【0066】

また、本発明においては、本発明の中性フェノールオキシダーゼに結合するものであれば、前記モノクローナル抗体の一部、すなわち、抗体断片であってもよい。前記抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv等が挙げられる。かかる抗体断片は、例えば、ペプチダーゼ等により、モノクローナル抗

体を消化することにより得られうる。例えば、F a b フラグメントは、前記モノクローナル抗体をパパイニンにより処理することにより得られ、F (a b ')₂ フラグメントは、前記モノクローナル抗体をペプシンにより処理することにより得られうる。

【0067】

本発明の抗体は、例えば、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I に対する結合性、親和性等について、E L I S A 法、O u c h t e r l o n y 法、免疫電気泳動法等により測定することにより評価されうる。

【0068】

本発明の抗体は、本発明の中性フェノールオキシダーゼの精製のためのアフィニティークロマトグラフィー、該中性フェノールオキシダーゼのスクリーニング等に用いることができる。

【0069】

本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、種々の染料、色素等と共に用いることにより、ケラチン繊維等の染色を行なうことができる。したがって、本発明により、染色方法及び染色用組成物が提供される。

【0070】

また、本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、該中性フェノールオキシダーゼの存在下で、染色対象物と染料とを接触させることにより、染色を行なうことができる。本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、繊維や毛髪の染色等において、特別な温度条件、p H 条件に調整することなく、外界環境条件下において行なうことができ、人体、環境等への影響を低減させることができるという優れた効果を発揮する。

【0071】

本発明の染色方法を適用しうる染色対象物としては、例えば、綿、ジアセテート、亜麻、リンネル、リオセル、ポリアクリル、ポリアミド、ポリエステル、ラミー、レーエン、テンセル、トリアセテート、毛皮、獣皮、皮革、絹又はウール製の布帛、糸、繊維、衣料、フィルム、木材、毛髪等が挙げられる。

【0072】

前記染料としては、医薬部外品原料規格に収載されている酸化染料やインドリン及びインドール化合物等が挙げられ、かかる染料は、単独又は複数を組み合わせて用いることができる。また、カップリング剤を用いることもできる。また、直接染料も用いられうる。

【0073】

インドリン及びインドリン化合物としては、具体的には、インドリン、5, 6-ジヒドロキシインドリン、N-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、N-エチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、N-ブチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、4-ヒドロキシ-5-メトキシインドリン、6-ヒドロキシ-7-メトキシインドリン、6, 7-ジヒドロキシインドリン、4, 5-ジヒドロキシインドリン、4-メトキシ-6-ヒドロキシインドリン、N-ヘキシル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、2-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、3-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、4-ヒドロキシインドリン、2, 3-ジメチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、2-メチル-5-エチル-6-ヒドロキシインドリン、2-メチル-5-ヒドロキシ-6- β -ヒドロキシエチルインドリン、4-ヒドロキシプロピルインドリン、2-ヒドロキシ-3-メトキシインドリン、6-ヒドロキシ-5-メトキシインドリン、6-ヒドロキシインドリン、5-ヒドロキシインドリン、7-ヒドロキシインドリン、7-アミノインドリン、5-アミノインドリン、4-アミノインドリン、5, 6-ジヒドロキシインドリンカルボン酸、1-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、並びにこれらの塩類等を例示されうる。

【0074】

インドール化合物として、具体的には、4-ヒドロキシインドール、5-ヒドロキシインドール、5, 6-ジヒドロキシインドール、5, 6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸、5, 6-トリ (t-ブトキシカルボニルオキシ) インドール、5, 6-ジ (t-ブトキシカルボニルオキシ) インドール、5-t-ブトキシカルボニルオキシ-6-ヒドロキシインドール、6-t-ブトキシカルボニルオキシ-5-ヒドロキシインドール、5, 6-ジ (エトキシカルボニルオ

キシ) インドール、5, 6-ジ (エチルカルバモイルオキシ) インドール、1-ピバロイル-5- (ピバロイルオキシメトキシ) -6-ピバロイルオキシインドール、1-ピバロイル-5-ピバロイルオキシメトキシ-6-ヒドロキシインドール、5, 6- (オキシカルボニルメトキシ) インドール等が挙げられる。

【0075】

医薬部外品原料規格に記載されている酸化染料としては、具体的に、5-アミノ-*o*-クレゾール、*o*-アミノフェノール、*m*-アミノフェノール、*p*-アミノフェノール、2, 6-ジアミノピリジン、5- (2-ヒドロキシエチルアミノ) -2-メチルフェノール、*N*, *N*-ビス (β -ヒドロキシ) -*p*-フェニレンジアミン・硫酸塩、*p*-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン、*p*-ニトロ-2', 4'-ジアミノアゾベンゼン・硫酸ナトリウム、トルエン-2, 5-ジアミン、5-アミノ-*o*-クレゾール・硫酸塩、*p*-アミノフェノール・硫酸塩、*o*-クロロ-*p*-フェニレンジアミン・硫酸塩、4, 4'-ジアミノジフェニルアミン・硫酸塩、*p*-メチルアミノフェノール・硫酸塩、*p*-フェニレンジアミン・硫酸塩、*m*-フェニレンジアミン・硫酸塩、トルエン-2, 5-ジアミン・硫酸塩、2, 4-ジアミノフェノキシエタノール・塩酸塩、トルエン-2, 5-ジアミン・塩酸塩、*m*-フェニレンジアミン・塩酸塩、2, 4-ジアミノフェノール・塩酸塩、3, 3'-イミノジフェノール、*p*-フェニレンジアミン・塩酸塩、*N*-フェニル-*p*-フェニレンジアミン・塩酸塩、*N*-フェニル-*p*-フェニレンジアミン・酢酸塩、1, 5-ジヒドキシナフタレン、トルエン-3, 4-ジアミン、*p*-メチルアミノフェノール、*N*, *N*'-ビス (4-アミノフェニル) -2, 5-ジアミノ-1, 4-キノンジイミン、*o*-アミノフェノール・硫酸塩、2, 4-ジアミノフェノール・硫酸塩、*m*-アミノフェノール・硫酸塩等を例示される。

【0076】

また、本発明においては、2-アミノ-4-ニトロフェノール、2-アミノ-5-ニトロフェノール、1-アミノ-4-メチルアミノアントラキノン、ニトロ-*p*-フェニレンジアミン・塩酸塩、1, 4-ジアミノアントラキノン、ニトロ-*p*-フェニレンジアミン、ピクラミン酸、ピクラミン酸ナトリウム、2-アミ

ノー5-ニトロフェノール・硫酸塩、レゾルシノール、ニトロ-p-フェニレンジアミン・硫酸塩、p-ニトロ-o-フェニレンジアミン・硫酸塩、p-ニトロ-m-フェニレンジアミン・硫酸塩等の直接染料も用いられうる。

【0077】

本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I の存在下における染色対象物と染料との接触は、例えば、染料と該中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I とを使用時に混合して染色対象物と接触するか、あるいは嫌気性条件下で保存した染料と該中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I との混合物を使用時に大気中で染色対象物と接触することにより行なわれる。本発明の染色方法は、本発明の中性フェノールオキシダーゼを、染色用組成物として用いることにより行なわれうる。

【0078】

本発明の染色用組成物としては、本発明の中性フェノールオキシダーゼと染料とを含有した組成物；本発明の中性フェノールオキシダーゼを含有した組成物 A と染料等を含有した組成物 B との組み合わせ等が挙げられる。

【0079】

本発明の染色用組成物には、酵素活性を阻害しない範囲で、チオ乳酸、亜硫酸ナトリウム、N-アセチル-L-システイン等の還元剤を配合することができる。また、本発明の効果を損わない範囲で、前記成分の他に、界面活性剤、油性成分、シリコン類、増粘剤、溶剤、水、キレート剤、香料等を適宜配合することもできる。

【0080】

【実施例】

以下、実施例により、本発明を更に詳細に説明するが、本発明は、かかる実施例により、何ら限定されるものではない。

【0081】

実施例 1 エノキダケ〔フラムリナ・ベルティペス (Flammulina velutipes)〕 IFO30601株の粗酵素液の調製

(1) 培養条件の検討

フェノールオキシダーゼの誘導のための培養条件のうち、培養 pH 条件の検討を例として挙げる。

【0082】

ラッカーゼの製造法については、特公昭 60-156385 号公報において、イルベックス・ラリテウス ATCC 20123 を用い、pH 6.0 で 3 日間培養を行なうことにより、至適 pH が 4.5 付近の酸性ラッカーゼを得る方法が開示されている。

【0083】

本実施例においては、フラムリナ・ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO 30601 株において、フェノールオキシダーゼを誘導する培養方法の決定するために、培地の pH を 4.0 から 9.0 の範囲で任意に調整し、培養を行なうことにより、培養 pH 条件を検討した。

【0084】

以下に示す播種、菌糸体の切り分け、及び培地の添加の各操作をクリーンベンチ内で行なった。

【0085】

固体培養用寒天培地〔組成: 2.4 重量% ポテトデキストロースブロス〔ディフィコ (Difco) 社製〕、2.0 重量% 寒天、残部 水〕10 ml を含む滅菌シャーレに、フラムリナ・ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO 30601 株を 1 白金耳相当量播種し、25℃で 10 日間培養した。その後、寒天培地全体に成長した菌糸体を、滅菌した白金耳にて 5 mm 四方に切り分け、小片を得た。

【0086】

前記小片 10 片を、液体培養用培地 1〔組成: 2.4 重量% ポテトデキストロースブロス〔ディフィコ (Difco) 社製〕、残部 水; 121℃で 15 分間滅菌したもの〕に播種し、25℃で 7 日間、往復振盪培養 (150 往復/分) を行なった。なお、前記液体培養用培地 1 として、pH を 4.0 から 9.0 の範囲で任意に調整された培地のそれぞれを用いた。

【0087】

それぞれ培養 pH の異なる培養液サンプルを毎日サンプリングし、その酵素活性の変化を求めることにより、培養 pH 条件による酵素誘導の違いを明らかにした。

【0088】

酵素活性（酸化活性）は、酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）又はトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）を緩衝液とし、パラフェニレンジアミンを基質として用いて、470 nm における吸光度の変化により測定した。

【0089】

具体的には、96 穴のマイクロプレート〔コーニング（Corning）社製、Coster（登録商標）3368〕のウェル内で、0.2 M 緩衝液 0.1 ml に、0.025 M パラフェニレンジアミン水溶液 0.08 ml を添加し、基質溶液を調製した。この基質溶液と各サンプリングした培養液 0.02 ml とを混合して、470 nm における吸光度の変化を、Multi Spectrometer〔大日本製薬株式会社製、商品名：Viento〕を用いて測定することにより、酵素活性を求めた。なお、酵素活性は、470 nm における吸光度を、1 分間で 1 増加させる酵素量を 1 単位（U：ユニット）として定義した。

【0090】

各培養 pH 条件で 7 日間培養を行なった結果、pH 5.0 及び pH 8.0 のそれぞれの反応 pH における酵素活性測定は、共に、培養日数が 7 日目で酵素活性が最も高く、すべての培養 pH 条件で、培養日数の経過により、酵素活性の増加を示した。

【0091】

pH 5.0 にて酵素活性を測定した結果、pH 4.0 から 9.0 の pH 範囲で培養した各培養液において、すべて明確な酵素活性がみられなかった。具体的には、最も高い酵素活性を示したのは、pH 9.0 の培養 pH 条件で 7 日間培養することにより得られた培養液だったが、反応開始から 17 時間後の 470 nm における吸光度の変化は、わずか 0.12 であった。また、pH 6.0 の培養 pH

条件で7日間培養することにより得られた培養液について、17時間後の470 nmにおける吸光度の変化は、0.06であった。

【0092】

一方、pH 8.0にて酵素活性を測定した結果、pH 5.0から9.0のpH範囲で培養した各培養液において、すべて明確な酵素活性が示された。なお、pH 4.0で培養することにより得られた培養液は、明らかな酵素活性を示さなかったが、培養日数による酵素活性の増加はみられた。

【0093】

また、培養pHがより高いpHである培養液ほど、高い酵素活性を示した。最も高い酵素活性を示した培養液は、pH 9.0の培養pH条件で7日間培養することにより得られた培養液で、17時間後の470 nmにおける吸光度の変化は、1.27であった。また、pH 6.0の培養pH条件で7日間培養することにより得られた培養液について、17時間後の470 nmにおける吸光度の変化は、0.78であった。

【0094】

以上の結果から、フラムリナ・ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO30601株において、前記培養条件により誘導されるフェノールオキシダーゼは、中性フェノールオキシダーゼであり、また、酸性側に至適pHを有する酸性ラッカーゼ又は酸性フェノールオキシダーゼは誘導されないことがわかった。また、フラムリナ・ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO30601株においては、前記培養条件により、多量の酵素が誘導され、pH 8.0での酵素活性では、pH 9.0の培養pH条件で7日間培養することにより得られた培養液の酵素活性は、pH 6.0の培養pH条件で7日間培養することにより得られた培養液の酵素活性と比較して、約1.6倍も高くなることがわかった。

【0095】

このように、前記培養条件により、中性フェノールオキシダーゼを誘導することができ、該中性フェノールオキシダーゼを収率よく生産することができる。

【0096】

(2) 培養法の検討

以下に示す播種、菌糸体の切り分け、及び培地の添加の各操作をクリーンベンチ内で行なった。なお、かかる培養では、まず、菌体を生育させる培養を行ない、ついで、酵素生産量を増加させる培養を行なう方法を検討した。

【0097】

固体培養用寒天培地〔組成：2.4重量% ポテトデキストロースブロス〔デフィコ (Difco) 社製〕、2.0重量% 寒天、残部 水〕 10ml を含む滅菌シャーレに、エノキダケ〔フラムリナ・ベルティペス (Flammulina velutipes)〕 IFO30601株を1白金耳相当量播種し、25℃で10日間培養した。その後、寒天培地全体に成長した菌糸体を、滅菌した白金耳にて5mm四方に切り分けた。

【0098】

前記小片 10片を、液体培養用培地1〔組成：2.4重量% ポテトデキストロースブロス〔デフィコ (Difco) 社製〕、残部 水 (pH5.2) ; 121℃で15分間滅菌したもの〕に播種し、25℃で7日間、往復振盪培養 (150往復/分) を行なった。

【0099】

得られた培養液全量を、2L容の三角フラスコ中500mlの前記液体培養用培地1に添加し、25℃で3週間、往復振盪培養 (100往復/分) を行なった。

【0100】

その後、成長したペレット状の菌糸体を静置沈殿させ、培養液を取り去り、残部の菌糸体に、液体培養用培地2〔組成：1.0重量% グルコース、0.1重量% 酵母エキス、0.14重量% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.36重量% K_2HPO_4 、0.02重量% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.10重量% ミネラル混合液 (組成：1.0重量% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.0重量% ZnCl_2 、0.7重量% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.5重量% $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5重量% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、pH9.2 ; 121℃で15分間滅菌したもの〕 500ml を添加し、さらに25℃で3日間培養した。

【0101】

その後、成長したペレット状の菌糸体を静置沈殿させ、デカンテーションにより培養液を回収した。

【0102】

回収された培養液は、淡黄色若しくは黄褐色の清澄又は濁った液体であった。回収された培養液は、全容量 3060 ml、総力価 13100 U、総タンパク質量 778 mg、比活性 16.8 U/mg タンパク質であった。

【0103】

(3) 粗酵素液の調製

前記(2)で回収された培養液を減圧濾過し、濾液を得た。

【0104】

前記濾液の pH を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液により 7.5 に調整した。pH 調整後の濾液 1 L に対して、5 g (乾燥重量) の DEAE-セルロース〔シグマ (Sigma) 社製〕担体を添加し、4℃で 30 分間振盪攪拌した。その後、10 分間静置し、上清を除去した。

【0105】

回収された DEAE-セルロース担体を、該担体の 3 倍容量の 1 M 塩化ナトリウムを含有した 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に添加した。得られた混合溶液を 5 分間振盪攪拌して、DEAE-セルロース担体に吸着したタンパク質を溶出させた。得られた DEAE-セルロース溶出液を、減圧濾過にて回収し、4℃で脱イオン水に対して透析し、得られた産物を凍結乾燥し、凍結乾燥物を得た (全重量 630 mg、総力価 7326 U、総タンパク質量 110 mg、比活性 66.4 U/mg タンパク質)。なお、凍結乾燥物の力価は、該凍結乾燥物 1 mg に対して、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)

1 ml に溶解させ、ついで、得られた溶液 0.01 ml と、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.089 ml に、0.05 M 2,6-ジメトキシフェノール 0.1 ml (終濃度 0.005 mM) を添加して得られた基質溶液とを混合し、得られた混合物について、前記(1)に記載の手法と同様に、470 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を求めた

。また、前記凍結乾燥物の水溶液について、F o l m - L o w r y 法により、タンパク質量を定量した。

【0106】

前記DEAE-セルロースで得られた凍結乾燥物を再度溶解させた溶液を、n a t i v e - P A G E に供し、電気泳動後に得られたゲルを、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で20分間振盪攪拌した。その後、0.005M 2,6-ジメトキシフェノール、0.005M オルト-アミノフェノール及び0.001M パラーフェニレンジアミンのいずれかを含み0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中でゲルを5分間振盪攪拌することにより活性染色を行なった。活性染色の結果を図1に示す。

【0107】

図1に示すように、活性染色の結果より、フラムリナ・ベルティペス (F l a m m u l i n a v e l u t i p e s) I F O 3 0 6 0 1 株を前記(2)に示される培養方法にしたがって培養することによって生産される培養液には、少なくとも3つの中性フェノールオキシダーゼが含まれることがわかった。

【0108】

(4) 中性フェノールオキシダーゼの精製 [イオン交換クロマトグラフィー (Q-セファロースカラム)]

前記(3)で得られた凍結乾燥物630mgを、0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 10mlに溶解させ、商品名: D I S M I C - 1 3 P [アドバンテック (A D V A N T E C) 社製] を用いて、遠心濾過により不溶物を除去し、濾液を得た。

【0109】

前記濾液49mlを、F P L C システム [ファルマシア (P h a r m a c i a) 社製] を用いて、0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化された商品名: Q-セファロースカラム [2.6×10cm、ファルマシア (P h a r m a c i a) 社製] に供した。塩化ナトリウム水溶液を0から1Mの濃度範囲で用いた勾配溶出法により、前記カラムに吸着された中性フェノールオキシダーゼのうちの2種 (中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダー

ゼII)を溶出した。中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIの画分は、得られた各溶出画分について、470nmにおける2,6-ジメトキシフェノールに対する酵素活性と、native-PAGE後のパラフェニレンジアミンによる活性染色とを行なうことにより決定された。

【0110】

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性は、0.2M リン酸ナトリウム (pH7.0) 0.896mlに、0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1mlを添加し、基質溶液を得、得られた基質溶液と、溶出画分 0.004mlとを混合し、得られた混合物について、470nmにおける吸光度の変化を測定することにより、算出した。

【0111】

イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラムを図2に示す。図2において、280nmにおける吸光度(図2中、A280)の変化は、各画分中のタンパク質量の変化を示し、400nmにおける吸光度(図2中、A400)の変化は、各フラクション中の糖質量の変化を示し、470nmにおける吸光度(図2中、A470)の変化は、各画分中の酵素活性の変化を示す。

【0112】

中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIの各画分について、native-PAGE後のパラフェニレンジアミンによる活性染色は単一のバンドを示したが、native-PAGE後のクーマシーブリアントブルー染色では、複数のバンドがみられた。得られた中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIのそれぞれの画分を回収し、透析後、凍結乾燥を行なった。

【0113】

得られた中性フェノールオキシダーゼIの画分は、全容量7.5ml、総力価2505U、総タンパク質量5.4mg、比活性463.9U/mgタンパク質であった。また、中性フェノールオキシダーゼIIの画分は、全容量10.5ml、総力価3630U、総タンパク質量41.0mg、比活性88.5U/mgタンパク質であった。

【0114】

(5) 中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の精製〔ゲル濾過クロマトグラフィー〕

前記(3)で得られた中性フェノールオキシダーゼ I の凍結乾燥物を、0.1 M 塩化ナトリウムを含む0.05 M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0) 1.5 ml に溶解させた。得られた産物を、FPLC システム〔ファルマシア (Pharmacia) 社製〕を用いて、0.1 M 塩化ナトリウムを含む0.05 M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0) で平衡化した商品名: セファクリル S-100 HR カラム〔1.6×60 cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製〕に供した。ついで、0.1 M 塩化ナトリウムを含む0.05 M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を用いて、前記カラムに吸着された中性フェノールオキシダーゼ I を溶出させた。

【0115】

中性フェノールオキシダーゼ I について、ゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムを図3に示す。図3において、280 nm における吸光度(図3中、A280)の変化は、各画分中のタンパク質量の変化を示し、470 nm における吸光度(図3中、A470)の変化は、各画分中の酵素活性の変化を示す。

【0116】

中性フェノールオキシダーゼ I の画分は、得られた画分について、470 nm における2,6-ジメトキシフェノールに対する酵素活性の測定と、SDS-PAGE後のパラフェニレンジアミンによる活性染色と、SDS-PAGE後のクーマシーブリリアントブルー染色とを行なうことにより決定された。SDS-PAGE後のパラフェニレンジアミンによる活性染色及びクーマシーブリリアントブルー染色の結果、単一のバンドを示した。

【0117】

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性は、0.2 M リン酸ナトリウム(pH 7.0) 0.896 ml に、0.05 M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1 ml を添加し、基質溶液を得、得られた基質溶液と中性フェノールオキシダーゼ I の画分 0.004 ml とを混合し、得られ

た混合物について、470 nmにおける吸光度の変化を測定することにより求めた。

【0118】

酵素活性を示し、活性染色により染色された画分を、中性フェノールオキシダーゼ I として回収した。得られた中性フェノールオキシダーゼ I の画分は、全容量 10 ml、総力価 1530 U、総タンパク質量 1.6 mg、比活性 956.3 U/mg タンパク質であった。

【0119】

一方、前記 (3) で得られた中性フェノールオキシダーゼ II の凍結乾燥物を、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 1.5 ml に溶解させた。得られた産物を、FPLC システム [ファルマシア (Pharmacia) 社製] を用いて、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した商品名: セファクリル S-100 HR カラム [1.6 × 60 cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製] に供した。ついで、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて、前記カラムに吸着された本発明の中性フェノールオキシダーゼ II を溶出した。

【0120】

中性フェノールオキシダーゼ II について、ゲルクロマトグラフィーのクロマトグラムを図 4 に示す。図 4 において、280 nm における吸光度 (図 4 中、A 280) の変化は、各画分中のタンパク質量の変化を示し、470 nm における吸光度 (図 4 中、A 470) の変化は、各画分中の酵素活性の変化を示す。

【0121】

本発明の中性フェノールオキシダーゼ II の画分は、得られた画分について、470 nm における 2,6-ジメトキシフェノールに対する酵素活性の測定と、SDS-PAGE 後のパラフェニレンジアミンによる活性染色と、SDS-PAGE 後のクーマシーブリリアントブルー染色とを行なうことにより決定された。SDS-PAGE 後のパラフェニレンジアミンによる活性染色、及び、クーマシーブリリアントブルー染色の結果、単一のバンドを示した。

【0122】

2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性は、0.2M リン酸ナトリウム (pH 7.0) 0.896 ml に 0.05M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1 ml を添加し、基質溶液を得、得られた基質溶液と中性フェノールオキシダーゼ II の画分 0.004 ml とを混合し、得られた混合物について、470 nm における吸光度の変化により測定することにより求めた。

【0123】

酵素活性を示し、活性染色により染色された画分を、中性フェノールオキシダーゼ II として回収した。得られた中性フェノールオキシダーゼ II の画分は、全容量 11.5 ml、総力価 742 U、総タンパク質量 5.3 mg、比活性 140 U/mg タンパク質であった。

【0124】

上記の抽出・精製のスキームを図 5 に示す。また、各精製工程における中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の精製度、比活性を表 1 に示す。

【0125】

【表 1】

精製工程	総タンパク質量 (mg)	総力価 (U)	比活性 (U/mg タンパク質)	収率 (%)
培養液	778	13100	16.8	100.0
DEAE-セルロース	110	7326	66.4	55.9
Q-セファロース	5.4	2505	463.9	19.1
	41.0	3630	88.5	27.7
セファクリル S-100 HR	1.6	1530	956.3	11.7
	5.3	742	140.0	5.7

【0126】

実施例 2 中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I
の分子量

実施例 1 で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシ
ダーゼ I I のそれぞれ分子量を、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いたゲル濾過

法により測定した。

【0127】

ゲル濾過クロマトグラフィーには、FPLCシステム〔ファルマシア (Pharmacia) 社製〕を用いて、0.1M 塩化ナトリウムを含む0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した商品名:セファクリル S-100 HRカラム〔1.6×60cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製〕を用いた。

【0128】

前記実施例1の(5)で得られた中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIの溶液 3mlを、FPLCシステム〔ファルマシア (Pharmacia) 社製〕を用いて、0.1M 塩化ナトリウムを含む0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した商品名:セファクリル S-100HRカラム〔1.6×60cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製〕に供した。0.1M 塩化ナトリウムを含む0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて、前記カラムでゲル濾過クロマトグラフィーを行ない、中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIを溶出させ、溶出液量を測定した。なお、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIは、それぞれ別々に、ゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量を決定した。また、前記と同じ条件下で、分子量マーカーとして、分子量既知の4種のタンパク質 (分子量約67k、43k、25k、及び13.7kDa) をそれぞれ単独で添加し、それぞれの溶出液量を測定した。

【0129】

中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIの溶出時間と、分子量マーカーの溶出液量から得られた検量線とにより、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIのそれぞれの分子量を決定した。

【0130】

その結果、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIの分子量は、共に、約72kDaであった。

【0131】

実施例3 中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIの至適pH

中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIと各基質との反応において、緩衝液として、pHに応じて、0.2M グリシン水酸化ナトリウム緩衝液(pH 11.5、10.5及び9.5)、0.2M トリス塩酸緩衝液(pH 10.0、9.0、8.0及び7.0)、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5、7.0、6.5、6.0及び5.5)、0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5、5.0、4.5、4.0及び3.5)、0.2M グリシン塩酸緩衝液(pH 3.5、3.0及び2.0)を用いた。

【0132】

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合、前記実施例1の(4)で得られた中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIの画分0.02mlと、前記緩衝液のいずれか0.88mlと、0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液0.1mlとをマイクロキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、470nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ(Jasco)社製、商品名:V-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

【0133】

また、オルト-アミノフェノールを基質とした場合、前記2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の評価法において、0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0.05M オルト-アミノフェノールのジメチルスルホキシド溶液を用い、同様の操作を行ない、420nmにおける吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

【0134】

パラフェニレンジアミンを基質とした場合、前記2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の評価法において、0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0.05M パラフェニレンジアミン水溶液を用い、同様の操作を行ない、470nmにおける吸光度の変化を測定することにより

、酵素活性を評価した。

【0135】

シリングアルダジンを基質とした場合、前記2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の評価法において、0.05M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0.005M シリングアルダジンのエタノール溶液を用い、同様の操作を行ない、530nmにおける吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

【0136】

なお、酵素活性は、各基質に対して適切な波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位（U：ユニット）とした。

【0137】

中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIの至適pHの結果を、図6及び図7にそれぞれ示す。なお、図6及び図7において、最大活性を100とした場合の相対活性で示す。また、図6及び図7のそれぞれにおいて、パネルAは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルBは、オルト-アミノフェノールを基質とした場合を示し、パネルCは、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示し、パネルDは、シリングアルダジンを基質とした場合を示す。

【0138】

その結果、図6に示されるように、中性フェノールオキシダーゼIは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～7.0、オルト-アミノフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～7.0、パラフェニレンジアミンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～6.0、シリングアルダジンを基質として用いた場合、至適pHは、約6.5であることがわかった。

【0139】

また、図7に示されるように、中性フェノールオキシダーゼIIは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～6.0、オルト-アミノフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～

7. 0、パラフェニレンジアミンを基質として用いた場合、至適 pH は、約 5. 5 ~ 6. 0、シリungalダジンを基質として用いた場合、至適 pH は、約 6. 5 であることがわかった。

【0140】

実施例 4 中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の pH 安定性

中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II と各基質との反応において、緩衝液として、pH に応じて、0. 2 M グリシン水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 11. 5)、0. 2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 10. 0、9. 0 及び 8. 0)、0. 2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7. 0 及び 6. 0)、0. 2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5. 0 及び 4. 0)、0. 2 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3. 0 及び 2. 0) を用いた。

【0141】

前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の画分 0. 02 ml 前記緩衝液のいずれか 0. 18 ml とを混合して、30℃で 1 時間又は 20 時間インキュベートすることにより、前処理を行なった。

【0142】

ついで、前処理後の精製酵素液 0. 02 ml と前記緩衝液 0. 88 ml と、0. 05 M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液 0. 1 ml とを、マイクロキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、470 nm における吸光度の変化を分光光度計 [ジャスコ (Jasco) 社製、商品名: V-530] を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

【0143】

パラフェニレンジアミンを基質とした場合、前記 2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合において、0. 05 M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0. 05 M パラフェニレンジアミン水溶液を用い、同様の操作を行ない、同じく、470 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

【0144】

なお、酵素活性は、各基質で定めた波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素活性を1単位（U：ユニット）として定義した。

【0145】

中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の pH 安定性の結果を、図 8 及び図 9 にそれぞれ示す。なお、図 8 及び図 9 において、最大活性を 100 とした相対残存活性で示す。また、図 8 及び図 9 のそれぞれにおいて、パネル A 及び B は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル C 及び D は、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。さらに、図 8 及び図 9 のそれぞれにおいて、パネル A 及び C は、1 時間後の pH 安定性を示し、パネル B 及び D は、20 時間後の pH 安定性を示す。

【0146】

その結果、図 8 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I は、1 時間処理の場合、pH 7.0～10.0 で安定であり、最大活性に対し、75%以上の相対残存活性が保持されていた。また、20 時間処理の場合、pH 8.0～9.0 で安定であり、最大活性に対し、70%以上の相対残存活性が保持されていた。

【0147】

また、図 9 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ II は、1 時間処理の場合、pH 6.0～10.0 で安定であり、最大活性に対し、75%以上の相対残存活性が保持されていた。また、20 時間処理の場合、pH 7.0～10.0 で安定であり、最大活性に対し、75%以上の相対残存活性が保持されていた。

【0148】

実施例 5 中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の等電点

前記実施例 1 の（5）で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の等電点を調べるため、ポリアクリルアミドゲルを用いて等電点電気泳動を行なった。具体的には、終濃度 2% になるように、商品名：

Pharmalyte (pH 3-10; ファルマシア (Pharmacia) 社製) をアクリルアミド中に溶解し、過硫酸アンモニウム及び N, N, N', N' - テトラメチル-エチレンジアミン (TEMED) を添加することにより、終濃度 5% のポリアクリルアミドゲルを調製した。電極液としては、1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液を陰極液として、0.5 M 酢酸を陽極液として用いた。50 V の定電圧で 6 時間泳動を行なった。ゲル上の活性染色は、0.001 M パラ-フェニレンジアミンを含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に、泳動後のゲルを浸漬し、振盪攪拌することにより行なった。等電点の測定は、泳動後、ゲル上の試料を泳動していない部分の両端を、2.5 mm の幅で切り出し、得られた小片を脱イオン水に浸して、4℃ で抽出した液の pH を測定することにより行なった。

【0149】

中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の等電点電気泳動の結果を図 10 に示す。

【0150】

ポリアクリルアミドゲルを用いた等電点電気泳動により、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の等電点は、それぞれ、7.4 及び 6.8 と決定された。

【0151】

実施例 6 中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の至適温度

前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II について、それぞれの酵素活性を、種々の温度条件 (20、30、40、50、60、70、及び 80℃) 下にて、それぞれ別々に測定した。

【0152】

具体的には、2, 6-ジメトキシフェノールを基質として用いる場合、マイクロセントリフュージチューブ [ポレックスバイオプロダクツインコーポレイテッド (Porex Bio Products Inc.) 社製] 中、0.2 M リン酸

ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.88 ml と、0.05 M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1 ml と、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の画分 0.02 ml とを混合し、得られた混合物について、各反応温度にて 5 分間反応を行なった。その後、得られた反応液に、2 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.0) 0.1 ml を添加することにより、酵素反応を停止させた。

【0153】

また、パラフェニレンジアミンを基質とした場合、前記 2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性の測定法において、2,6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0.05 M パラフェニレンジアミン水溶液を用いて同様に操作を行なった。

【0154】

ついで、得られた反応産物について、分光光度計〔ジャスコ (Jasco) 社製、商品名: V-530〕により、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合及びパラフェニレンジアミンを基質とした場合共に、470 nm における吸光度を測定することにより、酵素活性を評価した。

【0155】

なお、酵素活性は、470 nm における吸光度を、1 分間で 1 増加させる酵素量を 1 単位 (U: ユニット) として定義した。

【0156】

中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の至適温度の結果を、図 11 及び図 12 にそれぞれ示す。なお、図 11 及び図 12 において、最大活性を 100 とした相対活性で示す。また、図 11 及び図 12 のそれぞれにおいて、パネル A は、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル B は、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

【0157】

その結果、図 11 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I の至適温度は、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、20~50℃で、最大活性に対し、80%以上の相対活性を有しており、パラフェニレンジア

ミンを基質として用いた場合、30～60℃で最大活性に対し、60%以上の相対活性を有していることがわかった。

【0158】

また、図12に示されるように、中性フェノールオキシダーゼIIの至適温度は、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、30～60℃で、最大活性に対し、70%以上の相対活性を有しており、パラフェニレンジアミンを基質として用いた場合、40～70℃で、最大活性に対し、80%以上の相対活性を有していることがわかった。

【0159】

実施例7 中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIの熱安定性

pH7.0及びpH8.5のそれぞれにおいて、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIの熱安定性を調べた。

【0160】

前記実施例1の(5)で得られた中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIの画分 0.005mlを、種々の温度(20、30、40、50、60、70、及び80℃)下にて、0.045mlの0.2M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)(全量0.005ml)中で、種々の時間(5、10、20、40、及び60分間)インキュベートすることにより、前処理を行なった。

【0161】

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合、前処理を行なった酵素溶液 0.02mlと、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5) 0.88ml、0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1mlとを、マイクロキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、470nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ(Jasco)社製、商品名:V-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

【0162】

また、パラフェニレンジアミンを基質とした場合、前記2,6-ジメトキシ

フェノールを基質とした場合の評価法において、2, 6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0.05M パラーフェニレンジアミン水溶液を用いて同様に操作を行ない、同じく、470nmにおける吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

【0163】

なお、酵素活性は、470nmにおける吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位（U：ユニット）として定義した。

【0164】

中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIのそれぞれのpH8.5における熱安定性を求める場合、前記pH7.0における前処理の代わりに、前記実施例1の（5）で得られた中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIの画分 0.048mlを、種々の温度（30、40、50、60、70、及び80℃）下にて、0.012mlの0.5M トリス塩酸緩衝液（pH9.0）中で、種々の時間（5、10、20、40、及び60分間）インキュベートすることにより、前処理を行なった（最終pH：8.5）。

【0165】

中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIの熱安定性の結果を、図13及び図14にそれぞれ示す。なお、図13及び図14において、最大活性を100とした相対残存活性で示す。また、図13及び図14のそれぞれにおいて、パネルA及びBは、pH7.0における熱安定性を示し、パネルC及びDは、pH8.5における熱安定性を示す。さらに、図13及び図14のそれぞれにおいて、パネルA及びCは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルB及びDは、パラーフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

【0166】

その結果、図13に示されるように、中性フェノールオキシダーゼIのpH7.0における熱安定性は、1時間後の結果において、30℃まで、最大活性に対して、80%以上の相対残存活性を有していることがわかった。また、本発明の

中性フェノールオキシダーゼ I の pH 8.5 における熱安定性は、1 時間後の結果において、30℃まで、最大活性に対して、90%以上の相対残存活性を有していることがわかった。

【0167】

また、図 14 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ II の pH 7.0 における熱安定性は、1 時間後の結果において、50℃まで、最大活性に対して、90%以上の相対残存活性を有していることがわかった。また、中性フェノールオキシダーゼ I の pH 8.5 における熱安定性は、1 時間後の結果において、50℃まで、最大活性に対して、70%以上の相対残存活性を有していることがわかった。

【0168】

実施例 8 本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の基質特異性

本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の基質特異性を調べるために、パラフェニレンジアミン、4-ヒドロキシインドール、2-メトキシフェノール、2,6-ジメトキシフェノール、カテコール、パラアミノフェノール、オルトアミノフェノール、シリンガルダジン、ピリルビン、ABTS、NNS、及び L-チロシンを基質として用い、基質特異性を調べた。

【0169】

具体的には、パラフェニレンジアミン、4-ヒドロキシインドール、2-メトキシフェノール、2,6-ジメトキシフェノール、カテコール、ABTS、NNS を基質として用いた場合、前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の画分 0.02 ml と、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.88 ml と、0.05 M 基質水溶液 0.1 ml とをマイクロキュベット内で十分混合し、得られた混合物について、各基質で定めた波長における吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ (Jasco) 社製、商品名: V-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

【0170】

パラアミノフェノール又はオルトアミノフェノールを基質とする場合、前記酵素活性の評価法において、前記 0.05 M 基質水溶液の代わりに、0.05 M ジメチルスルホキシド溶液を用いて同様に操作を行ない、各基質で定めた波長における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

【0171】

シリングアルダジンを基質とした場合、前記酵素活性の評価法において、前記 0.05 M 基質水溶液の代わりに、0.005 M シリングアルダジンのエタノール溶液を用い、前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の画分 0.02 ml と、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.96 ml と、0.005 M シリングアルダジンエタノール溶液 0.02 ml とをマイクロキュベット内で十分混合し、得られた混合物について、530 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

【0172】

ビリルビンを基質とする場合、前記酵素活性の評価法において、前記 0.05 M 基質水溶液の代わりに、0.01 M ジメチルスルホキシド溶液を用いて、同様に操作を行ない、450 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

【0173】

Ｌーチロシンを基質とした場合、前記酵素活性の評価法において、前記 0.05 M 基質水溶液の代わりに、0.001 M Ｌーチロシンを含む 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を用い、前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の画分 0.02 ml と、0.001 M Ｌーチロシンを含む 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 0.98 ml とをマイクロキュベット内で十分混合し、得られた混合物について、490 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

【0174】

なお、酵素活性は、各基質で定められた波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位（U：ユニット）として定義した。

【0175】

中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II それぞれについて、各基質における測定波長及び結果を、表2及び表3にそれぞれ示す。

【0176】

【表2】

基質	測定波長 (nm)	U
パラ-フェニレンジアミン	470	0.038
4-ヒドロキシインドール	470	0.005
2-メトキシフェノール	470	0.022
2,6-ジメトキシフェノール	470	0.234
カテコール	400	0.016
パラ-アミノフェノール	400	0.032
オルト-アミノフェノール	420	0.072
シリングアルダジン	530	0.596
ビリルビン	450	-0.215
ABTS	420	0.320
NNS	410	-0.017
L-チロシン	490	0.000

【0177】

【表3】

基質	測定波長 (nm)	U
パラ-フェニレンジアミン	470	0.070
4-ヒドロキシインドール	470	0.016
2-メトキシフェノール	470	0.080
2,6-ジメトキシフェノール	470	0.676
カテコール	400	0.032
パラ-アミノフェノール	400	0.068
オルト-アミノフェノール	420	0.130
シリングアルダジン	530	1.014
ビリルビン	450	-0.458
ABTS	420	0.752
NNS	410	-0.032
L-チロシン	490	0.000

【0178】

表2及び表3のそれぞれの結果より、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、共にフェノールオキシダーゼ活性を有することがわかった。より詳しくは、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、共にシリングアルダジン及びABTSの直接酸化（発色）反

応を触媒することから、ラッカーゼ活性を有し、加えて、ビリルビンの直接酸化による分解反応を触媒することから、ビリルビンオキシダーゼ活性をも有することが示される。しかし、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、共に L-チロシンの直接酸化（発色）反応を触媒しないことから、チロシナーゼ活性は有していない。

【0179】

また、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II は、フェノールオキシダーゼ・メディエーターである ABTS、NNS を基質として酸化することから、これらの基質をメディエーターとして仲介することによる、酵素反応の増強や、従来触媒されにくかった（触媒されなかった）反応をも効率よく行なうこと等ができる。

【0180】

実施例 9 阻害剤による中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の活性阻害

阻害剤として、N-アセチル-L-システイン、チオグリコール酸ナトリウム、アジ化ナトリウム、シアン化ナトリウム又はエチレンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸 (EDTA) を用い、阻害剤の濃度を種々に設定（最終濃度：0、0.1、1.0、及び 10.0 mM）させることにより、阻害剤が基質に対する酵素活性に与える影響を測定した。

【0181】

具体的には、基質として、2,6-ジメトキシフェノール及びパラフェニレンジアミンのそれぞれを用い、0.05 M 基質水溶液として、反応に用いた。

【0182】

前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の画分 0.025 ml を、所定の濃度に調整した阻害剤水溶液 0.125 ml に添加し、十分混合し、得られた混合液を 30℃で 10 分間インキュベートした。その後、得られた混合液 0.12 ml と、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.88 ml と、0.05 M 基質水溶液 0.1 ml とを、マイクロキュベット内で十分混合し、得られた混合

物について、470 nmにおける吸光度の変化を、分光光度計〔ジャスコ（J a s c o）社製、商品名：V-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

【0183】

なお、酵素活性は、470 nmにおける吸光度を1分間で1増加させる酵素量を1単位（U：ユニット）として定義した。

【0184】

中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II について、各基質における測定波長と、阻害剤による酵素活性阻害の結果とを、表4及び表5にそれぞれ示す。

【0185】

【表 4】

N-アセチル-L-システイン		
濃度 (mM)	2,6-ジメトキシフェノール	パラ-フェニレンジアミン
0.0	100	100
0.1	47	28
1.0	13	6
10.0	1	0

チオグリコール酸ナトリウム		
濃度 (mM)	2,6-ジメトキシフェノール	パラ-フェニレンジアミン
0.0	100	100
0.1	49	22
1.0	3	6
10.0	0	0

アジ化ナトリウム		
濃度 (mM)	2,6-ジメトキシフェノール	パラ-フェニレンジアミン
0.0	100	100
0.1	22	33
1.0	2	11
10.0	1	6

シアン化ナトリウム		
濃度 (mM)	2,6-ジメトキシフェノール	パラ-フェニレンジアミン
0.0	100	100
0.1	39	50
1.0	5	0
10.0	1	0

EDTA		
濃度 (mM)	2,6-ジメトキシフェノール	パラ-フェニレンジアミン
0.0	100	100
0.1	94	82
1.0	86	88
10.0	79	82

【0186】

【表 5】

N-アセチル-L-システイン		
濃度 (mM)	2,6-ジメトキシフェノール	パラ-フェニレンジアミン
0.0	100	100
0.1	68	40
1.0	9	0
10.0	2	0

チオグリコール酸ナトリウム		
濃度 (mM)	2,6-ジメトキシフェノール	パラ-フェニレンジアミン
0.0	100	100
0.1	64	25
1.0	6	4
10.0	0	0

アジ化ナトリウム		
濃度 (mM)	2,6-ジメトキシフェノール	パラ-フェニレンジアミン
0.0	100	100
0.1	83	78
1.0	22	30
10.0	2	0

シアン化ナトリウム		
濃度 (mM)	2,6-ジメトキシフェノール	パラ-フェニレンジアミン
0.0	100	100
0.1	102	87
1.0	31	35
10.0	0	9

EDTA		
濃度 (mM)	2,6-ジメトキシフェノール	パラ-フェニレンジアミン
0.0	100	100
0.1	110	96
1.0	104	100
10.0	99	100

【0187】

表 4 及び表 5 のそれぞれの結果より、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、共に、N-アセチル-L-システイン、チオグリコール酸ナトリウム、アジ化ナトリウム、及びシアン化カリウムによって強く阻害されたが、EDTA にはほとんど阻害されなかった。これは、従来知られているフェノールオキシダーゼの阻害剤による酵素活性阻害の結果と一致した。

【0188】

実施例 10 中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ I の基質特異性 (直接的酸化反応)

上記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェ

ノールオキシダーゼ I I のそれぞれについて、種々の化合物に対する基質特異性（直接的酸化反応）を、基質の酸化重合による発色反応で測定した。

【0189】

基質としては、ジアミン化合物、アミノフェノール系化合物、フェノール化合物及びその他の化合物（抽出物）を用いた。基質溶液として、0.1% (V/V) [パラアミノフェノール、トリメチルヒドロキノン、ナフトール化合物、及びインドール化合物は、1% (V/V)] のジメチルスルホキシドを含む 0.001M 基質水溶液（その他の化合物については、2.0mg/ml の基質水溶液）を用いた。

【0190】

詳細には、前記酵素を含む酵素水溶液 0.8ml に、1.0M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.1ml 又は 1.0M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) 0.1ml を添加し、得られた混合物に、0.01M 基質溶液（その他の化合物については、2.0mg/ml）0.1ml を混合した。ついで、得られた混合物について、紫外可視分光光度計（島津製作所社製、商品名：UV-2450）を用いて、吸光度の変化を測定し、酵素活性（発色活性）を調べた。なお、酵素活性は、吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位（U；ユニット）として定義した。比較のために、ウルシ由来ラッカーゼ及びミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼについても、同様に、pH 6.5 及び 9.0 それぞれにおける基質特異性を調べた。

【0191】

直接的酸化反応の結果を、比活性で表6に示す。

【0192】

【表 6】

基質	測定波長 (nm)	比活性 (U/mg タンパク質)									
		フェノールオキシダーゼ I		フェノールオキシダーゼ II		ウルシ由来ラッカーゼ		ミロセシウム属菌類由来 ピリルビンオキシダーゼ			
		pH 6.5	pH 9.0	pH 6.5	pH 9.0	pH 6.5	pH 9.0	pH 6.5	pH 9.0	pH 6.5	pH 9.0
ジアミン化合物											
オルト-フェニレンジアミン	430	6.2	0.4	7.2	0.2	1.0	0.3	0.6	0.0		
パラ-フェニレンジアミン	470	5.0	0.8	5.5	0.3	11.3	4.7	3.4	0.5		
NN-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン	470	15.9	0.4	23.5	0.3	42.5	6.2	42.4	2.8		
トルエン-3,4-ジアミン	470	3.0	0.3	4.4	0.4	2.0	1.1	0.6	0.2		
パラ-アミノジフェニルアミン	470	2.9	0.4	6.0	0.3	30.0	3.2	15.4	1.2		
2-クロロ-1,4-フェニレンジアミン	450	7.8	0.2	6.2	0.2	4.7	0.1	2.6	0.0		
2,5-ジアミノトルエン	470	4.3	0.2	5.7	0.1	6.5	0.4	3.2	0.1		
アミノフェノール化合物											
オルト-アミノフェノール	450	20.9	2.9	31.3	2.1	6.6	27.2	1.8	9.3		
パラ-アミノフェノール	405	7.2	0.1	8.7	0.1	4.0	0.9	0.5	0.2		
5-アミノ-2-メチルフェノール	405	0.5	0.1	0.5	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1		
フェノール化合物											
2-メトキシフェノール	450	8.1	0.3	5.9	0.3	0.0	0.3	0.0	0.4		
2,6-ジメトキシフェノール	470	33.9	0.1	56.4	0.1	0.5	9.9	0.4	1.7		
カテコール	405	2.1	0.2	1.9	0.1	0.4	0.6	0.3	0.2		
プロトカテク酸	405	0.5	0.0	0.8	0.0	0.1	0.1	0.6	0.6		
ナフトール化合物											
1-ナフトール	405	0.9	0.4	0.7	0.2	0.0	1.0	0.1	1.0		
1,3-ジヒドロキシナフトール	450	20.9	6.0	18.7	1.9	3.8	9.3	12.6	16.7		
1,5-ジヒドロキシナフトール	470	2.9	1.0	4.2	0.3	3.1	6.3	3.3	5.1		
インドール化合物											
4-ヒドロキシインドール	405	3.2	0.6	5.1	0.4	2.2	9.3	1.8	2.7		
5-ヒドロキシインドール	405	1.1	0.1	2.6	0.1	0.0	0.3	0.1	0.1		
その他の化合物											
カテキン (緑茶抽出物)	405	0.8	0.2	0.6	0.2	0.6	1.2	0.6	1.4		
リグニンアルカリ抽出物 (稲由来)	450	2.5	0.4	1.3	0.5	0.0	0.2	0.6	1.6		
リグニンアルカリ抽出物 (針葉樹由来)	450	1.9	1.8	1.1	2.4	0.2	0.6	3.5	3.8		

【0193】

その結果、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、中性条件 (pH 6.5) 下で、ジアミン化合物、アミノフェノール化合物、フェノール化合物等の様々な基質の酸化反応を強く触媒した。

【0194】

また、中性フェノールオキシダーゼ I は、以下に示すような基質特異性を示した：

- 1) ジアミン化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミンの酸化反応を強く触媒した。
- 2) アミノフェノール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、オルト-アミノフェノールの酸化反応を強く触媒した。
- 3) フェノール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、2, 6-ジメトキシフェノールの酸化反応を強く触媒した。
- 4) ナフトール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、1, 3-ジヒドロキシナフタレンの酸化反応を強く触媒した。
- 5) インドール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。
- 6) その他の化合物 (抽出物) を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。

【0195】

さらに、中性フェノールオキシダーゼ I は、中性 (pH 6.5) 条件下とアルカリ性 (pH 9.0) 条件下での比活性を比較した場合、様々な基質において、中性 (pH 6.5) 条件下での比活性のほうが、アルカリ性 (pH 9.0) 条件下での比活性よりも高いことがわかった。

【0196】

また、中性フェノールオキシダーゼ I は、リグニンアルカリ抽出物 (針葉樹由

来)を基質とした場合、中性(pH 6.5)条件下でも強い触媒活性を示したが、アルカリ性(pH 9.0)条件下でも同等の強い触媒活性がみられた。

【0197】

一方、ウルシ由来ラッカーゼは、中性(pH 6.5)条件下での比活性と、アルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性とを比較した場合、ジアミン化合物以外の基質では、中性(pH 6.5)条件下での比活性よりもアルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性が高く、前記中性フェノールオキシダーゼ I とは大きく異なっていることがわかった。

【0198】

また、ミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼは、中性(pH 6.5)条件下での比活性とアルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性とを比較した場合、ジアミン化合物及びカテコール以外の基質では、中性(pH 6.5)条件下での比活性よりもアルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性が高く、前記中性フェノールオキシダーゼ I とは大きく異なっていることがわかった。

【0199】

中性フェノールオキシダーゼ II は、以下に示すような基質特異性を示した：

- 1) ジアミン化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(pH 6.5)条件下で、基質の酸化反応を触媒した。この中でも特に、N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミンの酸化反応を強く触媒した。
- 2) アミノフェノール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(pH 6.5)条件下で、基質の酸化反応を触媒した。この中でも特に、オルト-アミノフェノールの酸化反応を強く触媒した。
- 3) フェノール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(pH 6.5)条件下で、基質の酸化反応を触媒した。この中でも特に、2, 6-ジメトキシフェノールの酸化反応を強く触媒した。
- 4) ナフトール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(pH 6.5)条件下で、基質の酸化反応を触媒した。この中でも特に、1, 3-ジヒドロキシナフタレンの酸化反応を強く触媒した。
- 5) インドール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(

pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。

6) その他の化合物(抽出物)を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(pH 6.5)条件下で、基質の酸化反応を触媒した。

【0200】

さらに、中性フェノールオキシダーゼIIは、中性(pH 6.5)条件下での比活性とアルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性とを比較した場合、リグニンアルカリ抽出物(針葉樹由来)を基質とした場合以外は、様々な基質において、中性(pH 6.5)条件下での比活性のほうが、アルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性よりも高いことがわかった。

【0201】

また、リグニンアルカリ抽出物(針葉樹由来)を基質とした場合、中性(pH 6.5)条件下でも強い触媒活性を有していたが、アルカリ性(pH 9.0)条件下でさらに強い触媒活性がみられた。

【0202】

一方、ウルシ由来ラッカーゼは、中性(pH 6.5)条件下での比活性とアルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性とを比較した場合、ジアミン化合物以外の基質では、中性(pH 6.5)条件下での比活性よりもアルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性が高く、前記中性フェノールオキシダーゼIIとは大きく異なっていることがわかった。

【0203】

また、ミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼは、中性(pH 6.5)条件下での比活性とアルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性とを比較した場合、ジアミン化合物及びカテコール以外の基質では、中性(pH 6.5)条件下での比活性よりもアルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性が高く、中性フェノールオキシダーゼIIとは大きく異なっていることがわかった。

【0204】

前記フラムリナ・ベルティペス [*Flammulina velutipes*]
(IFO30601株)の中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIによれば、所望の基質に対する反応に応じて反応pH条件を変更

することなく、中性条件下で様々な基質を効率よく酸化させることができる。これにより、環境、人体等に対する影響が少ない温和な条件下での反応が可能であり、前記中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、フェノール樹脂の製造、人工漆塗料の製造、接着剤の製造、有機化合物の合成、染色、廃液処理、毒性化合物の解毒、木質の改善、合成版の製造、土壌の改良等の多方面への幅広い応用が期待される。

【0205】

実施例 11 中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の脱色活性

上記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II について、種々の染料に対する脱色活性を、染料が持つ紫外可視吸収スペクトルの極大値の変化により測定した。

【0206】

詳細には、前記酵素を含む酵素水溶液 0.8 ml に 1.0 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.1 ml を添加し、得られた混合物に、0.2 mg/ml 染料水溶液 0.1 ml を混合した。ついで、得られた混合物について、紫外可視分光光度計 (島津図製作所社製、商品名: UV-2450) を用いて、吸光度の変化を測定し、酵素活性 (脱色活性) を調べた。なお、酵素活性は、吸光度を、1 分間で 1 増加させる酵素活性を 1 単位 (U; ユニット) として定義した。比較のために、ウルシ由来ラッカーゼ及びミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼについても、同様に、脱色活性を調べた。

【0207】

各染料の測定波長及び脱色活性の結果を、比活性で表 7 に示す。

【0208】

【表 7】

染料	測定波長 (nm)	比活性 (U/mg タンパク質)				ミロセシウム属菌類由来 ピリルビンオキシダーゼ
		中性フェノールオキシダーゼ I	中性フェノールオキシダーゼ II	ウルシ由来ラッカーゼ		
ナチュラルオレンジ 6	450	-0.06	0.04	0.00		0.01
アシッドオレンジ 8	480	0.14	0.19	-0.02		-0.27
アシッドバイオレット 17	550	-0.17	-0.12	-0.01		0.09
レマソールブリリアントブルー R	600	0.11	0.02	0.00		-0.06
エバンスブルー	630	-0.86	-0.23	-0.01		-1.03
アシッドブルー 80	630	-0.50	-0.07	0.00		-0.37

【0209】

その結果、中性フェノールオキシダーゼ I は、ナチュラルオレンジ 6、アシッ

ドバイオレット17、エバンスブルー及びアシッドブルー80に対して、脱色活性を示した。

【0210】

また、中性フェノールオキシダーゼIIは、アシッドバイオレット17、エバンスブルー及びアシッドブルー80に対して、脱色活性を示した。

【0211】

さらに、中性フェノールオキシダーゼIと中性フェノールオキシダーゼIIとは、ナチュラルオレンジ6に対する脱色活性が異なっていることがわかった。

【0212】

一方、ウルシ由来ラッカーゼは、ほとんど脱色活性を示さず、前記中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIとは大きく異なっていることがわかった。

【0213】

ミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼは、前記中性フェノールオキシダーゼIとは、ナチュラルオレンジ6、アシッドオレンジ8、アシッドバイオレット17、レマゾールブリリアントブルーRにおいて大きく異なっており、本発明の中性フェノールオキシダーゼIIとは、アシッドオレンジ8、アシッドバイオレット17、レマゾールブリリアントブルーRにおいて大きく異なっていることがわかった。

【0214】

中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIは、中性条件下で染料を効率よく脱色することができる。これにより、前記中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIは、廃液処理、脱色、洗濯時の色移り防止等の多方面への幅広い応用が期待される。

【0215】

実施例12 中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIによる染毛試験

上記実施例1の(5)で得られた中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIを用いた染毛試験は、パラフェニレンジアミンを染料

として用いて、ヤク毛束及び羊毛布を酸化重合によって染色することにより行なった。

【0216】

詳細には、染毛試験においては、染料としてパラフェニレンジアミン 0.5 g と、増粘剤としてヒドロキシエチルセルロース 0.75 g と、界面活性剤として硬化ヒマシ油 1.0 g と、高級アルコールとしてセタノール 0.25 g と、ミリスチルアルコール 0.25 g とを添加し、得られた混合物の pH を、乳酸 0.5 g とモノエタノールアミンとにより、7.0 に調整し、イオン交換水により重量を 50 g とすることにより得られた組成物を用いた。また、ヤク毛束 1 g と羊毛布 1 枚 (2×3 cm) に対して、この組成物を 2 g と、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の酵素液を pH 7.0 においてパラフェニレンジアミンに対して合計 1.0 U になるように添加した混合物を塗布し、30℃で1時間保持した。

【0217】

その結果、ヤク毛束及び羊毛布は、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II を用いることにより、黒く染色された。

【0218】

【発明の効果】

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、高い安定性を示し、種々の基質、特に、フェノール化合物、アミノフェノール化合物及びジアミン化合物のいずれに対しても至適 pH に大きな変動がなく、中性付近の pH で効率よく基質と作用するという優れた効果を奏する。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼの生産方法によれば、本発明の中性フェノールオキシダーゼを、効率よく、簡便に、安価に、かつ大量に得ることができるという優れた効果を奏する。さらに、本発明の抗体によれば、本発明の中性フェノールオキシダーゼを、簡便に、回収、精製できるという優れた効果を奏する。また、本発明の染色方法によれば、種々の染料、具体的には、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物等により、簡便に、効率よく、繊維や毛髪を染色することができ、さらには、環境、人体等への影響が低減するという優れた効果を奏する。さらに

染色用組成物は、取扱いが簡便であり、簡便に、効率よく、繊維や毛髪を染色することができ、さらには、環境、人体等への影響が低減するという優れた効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、フラムリナ・ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO30601 株の DEAE-セルロース溶出画分の活性染色の結果を示す。図中、レーン 1 は、パラフェニレンジアミンを用いた活性染色の結果、レーン 2 は、2, 6-ジメトキシフェノールを用いた活性染色の結果、レーン 3 は、オルト-アミノフェノールを用いた活性染色の結果をそれぞれ示す。

【図 2】

図 2 は、イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す。図 2 中、菱形は、280 nm における吸光度 (A_{280}) に基づく、各画分中のタンパク質量の変化を示し、三角は、400 nm における吸光度 (A_{400}) に基づく、各フラクション中の糖質量の変化を示し、四角は、470 nm における吸光度 (A_{470}) に基づく、各画分中の酵素活性の変化を示し、十字は、塩化ナトリウム濃度 (M) を示す。

【図 3】

図 3 は、中性フェノールオキシダーゼ I のゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す。図 3 中、菱形は、280 nm における吸光度 (A_{280}) に基づく、各画分中のタンパク質量の変化を示し、四角は、470 nm における吸光度 (A_{470}) に基づく、各画分中の酵素活性の変化を示す。

【図 4】

図 4 は、中性フェノールオキシダーゼ II のゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す。図 3 中、菱形は、280 nm における吸光度 (A_{280}) に基づく、各画分中のタンパク質量の変化を示し、四角は、470 nm における吸光度 (A_{470}) に基づく、各画分中の酵素活性の変化を示す。

【図 5】

図 5 は、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II

の精製スキームを示す。

【図 6】

図 6 は、中性フェノールオキシダーゼ I の至適 pH の結果を示す。図 6 おいて、最大活性を 100 とした場合の相対活性で示す。また、図 6 において、パネル A は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル B は、オルト-アミノフェノールを基質とした場合を示し、パネル C は、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示し、パネル D は、シリングアルダジンを基質とした場合を示す。

【図 7】

図 7 は、中性フェノールオキシダーゼ I I の至適 pH の結果を示す。図 7 において、最大活性を 100 とした場合の相対活性で示す。また、図 7 において、パネル A は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル B は、オルト-アミノフェノールを基質とした場合を示し、パネル C は、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示し、パネル D は、シリングアルダジンを基質とした場合を示す。

【図 8】

図 8 は、中性フェノールオキシダーゼ I の pH 安定性の結果を示す。なお、図 8 において、最大活性を 100 とした相対残存活性で示す。また、図 8 中、パネル A 及び B は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル C 及び D は、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示す。さらに、図 8 中、パネル A 及び C は、1 時間後の pH 安定性を示し、パネル B 及び D は、20 時間後の pH 安定性を示す。

【図 9】

図 9 は、中性フェノールオキシダーゼ I I の pH 安定性の結果を示す。なお、図 8 において、最大活性を 100 とした相対残存活性で示す。また、図 9 中、パネル A 及び B は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル C 及び D は、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示す。さらに、図 9 中、パネル A 及び C は、1 時間後の pH 安定性を示し、パネル B 及び D は、20 時間後の pH 安定性を示す。

【図 10】

図 10 は、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の等電点電気泳動の結果を示す。

【図 11】

図 11 は、中性フェノールオキシダーゼ I の至適温度の結果を示す。なお、図 11 において、最大活性を 100 とした相対活性で示す。また、図 11 中、パネル A は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル B は、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

【図 12】

図 12 は、中性フェノールオキシダーゼ II の至適温度の結果を示す。なお、図 12 において、最大活性を 100 とした相対活性で示す。また、図 12 中、パネル A は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル B は、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

【図 13】

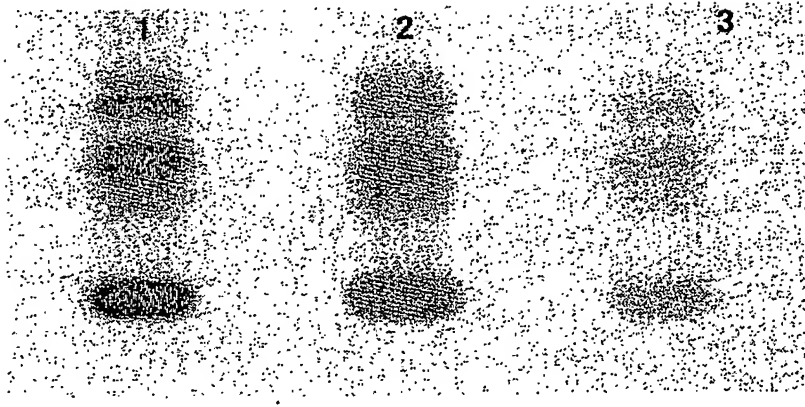
図 13 は、中性フェノールオキシダーゼ I の熱安定性の結果を示す。なお、図 13 において、最大活性を 100 とした相対残存活性で示す。また、図 13 中、パネル A 及び B は、pH 7.0 における熱安定性を示し、パネル C 及び D は、pH 8.5 における熱安定性を示す。さらに、図 13 中、パネル A 及び C は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル B 及び D は、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

【図 14】

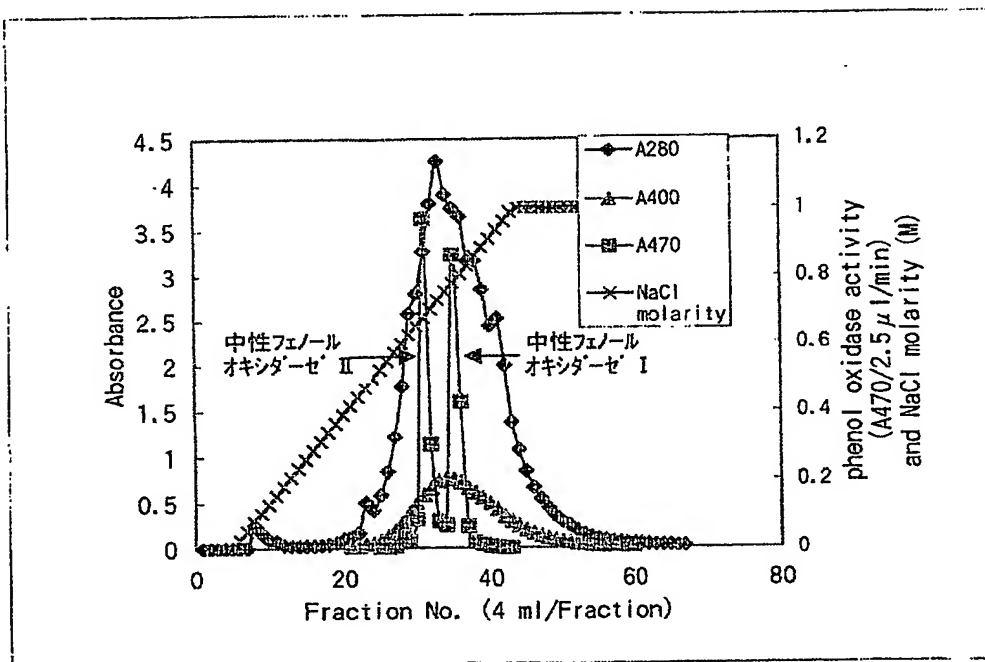
図 14 は、中性フェノールオキシダーゼ II の熱安定性の結果を示す。なお、図 14 において、最大活性を 100 とした相対残存活性で示す。また、図 14 中、パネル A 及び B は、pH 7.0 における熱安定性を示し、パネル C 及び D は、pH 8.5 における熱安定性を示す。さらに、図 14 中、パネル A 及び C は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル B 及び D は、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

【書類名】 図面

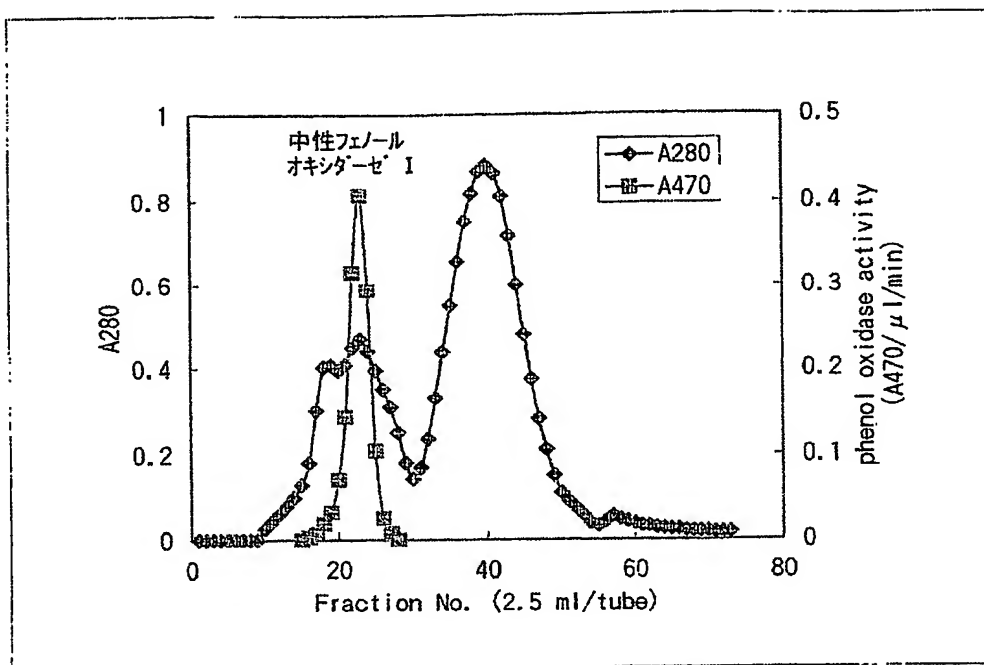
【図 1】



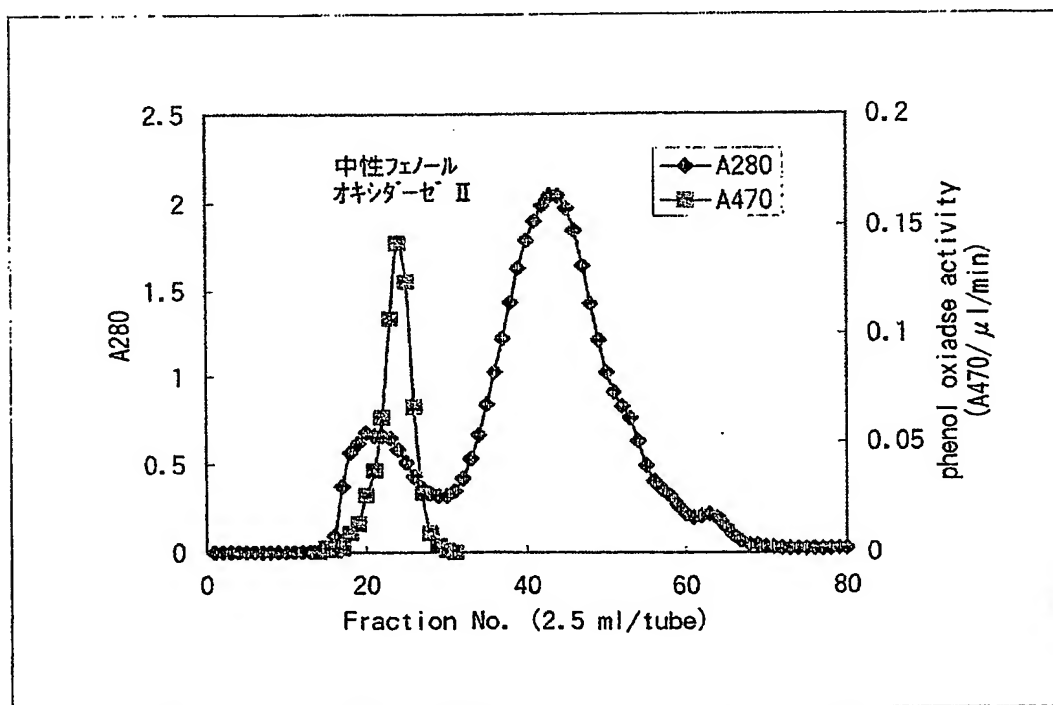
【図 2】



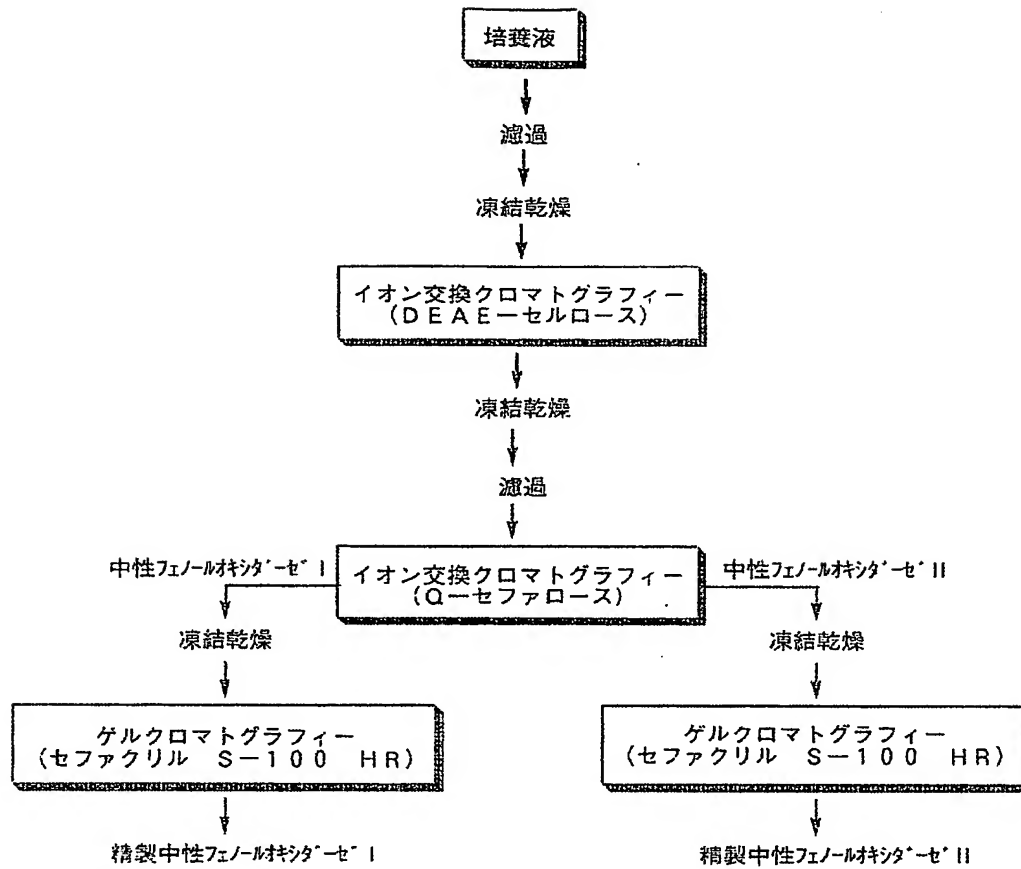
【図 3】



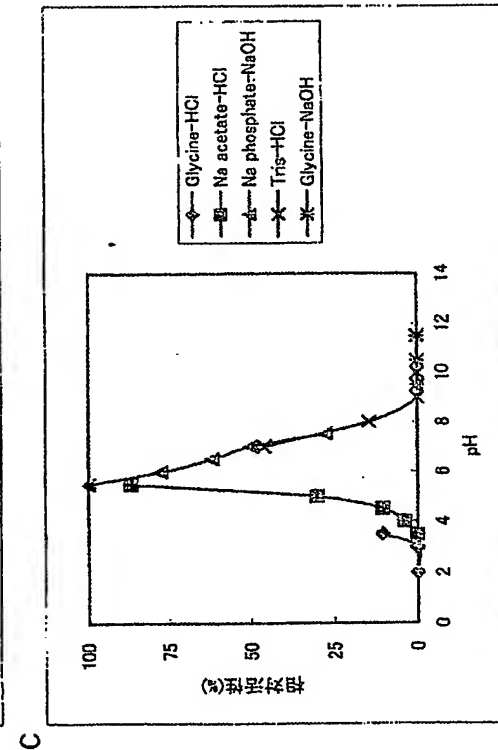
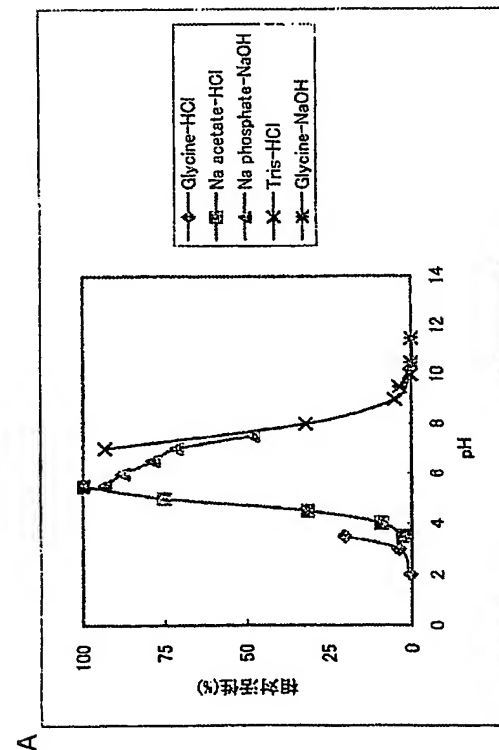
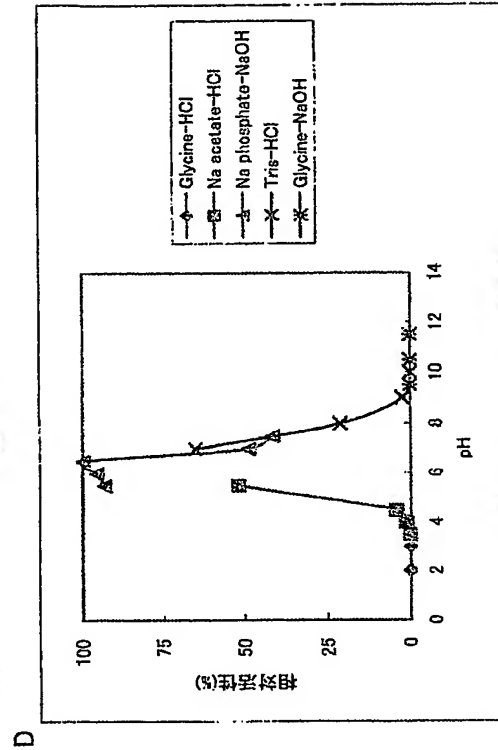
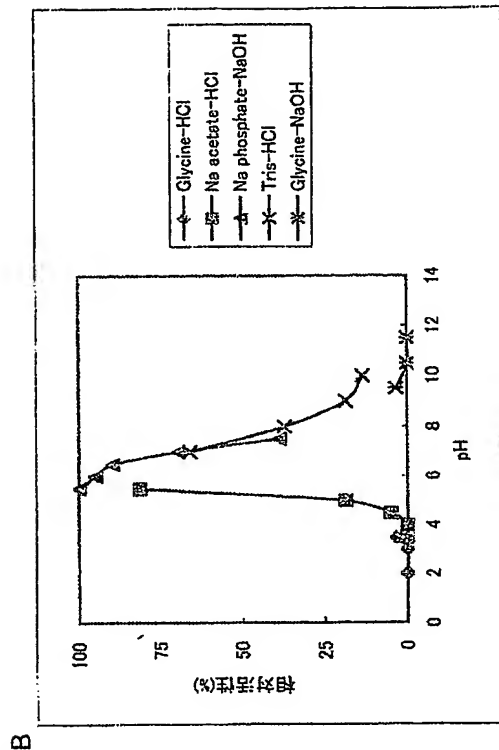
【図 4】



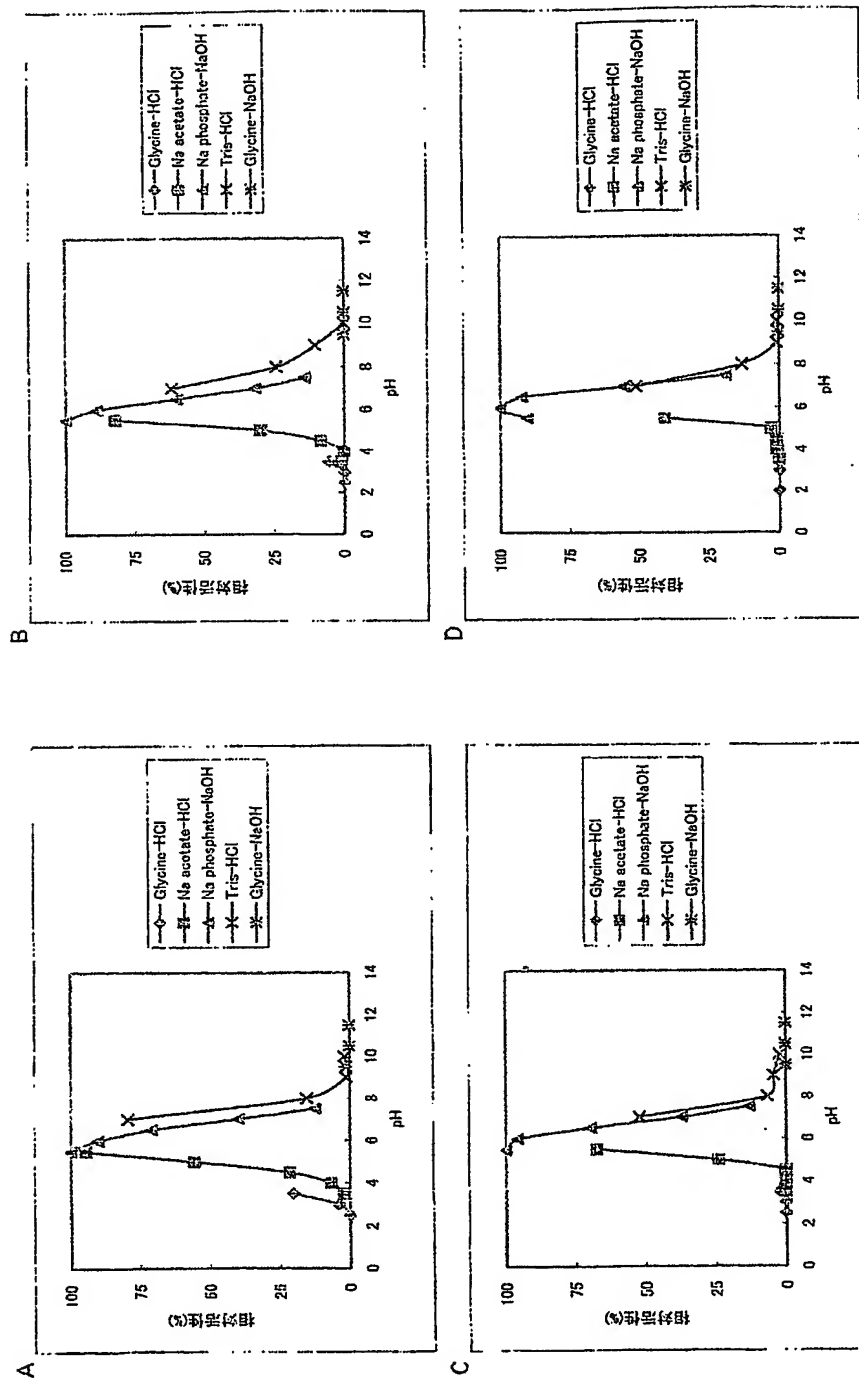
【図 5】



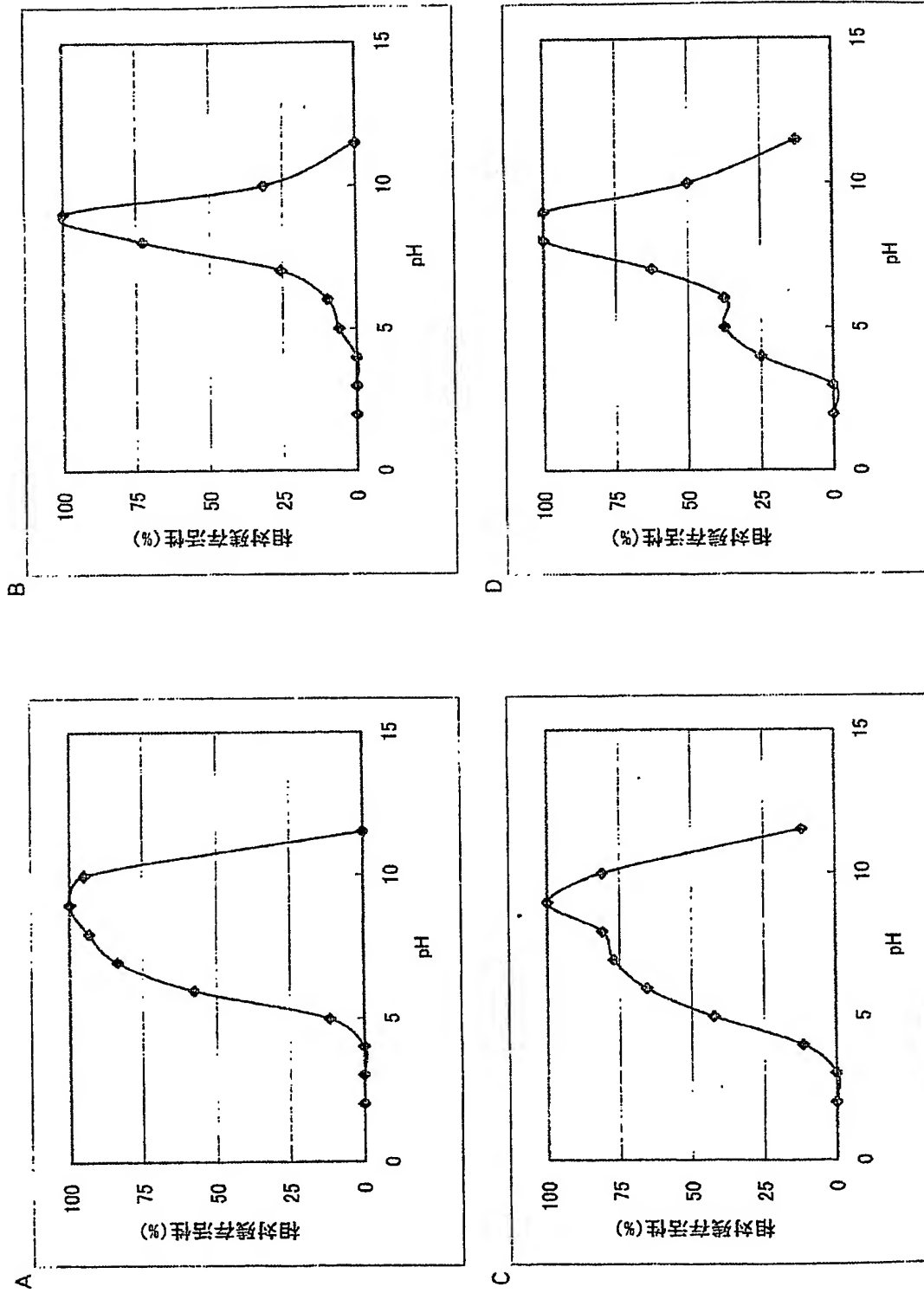
【図 6】



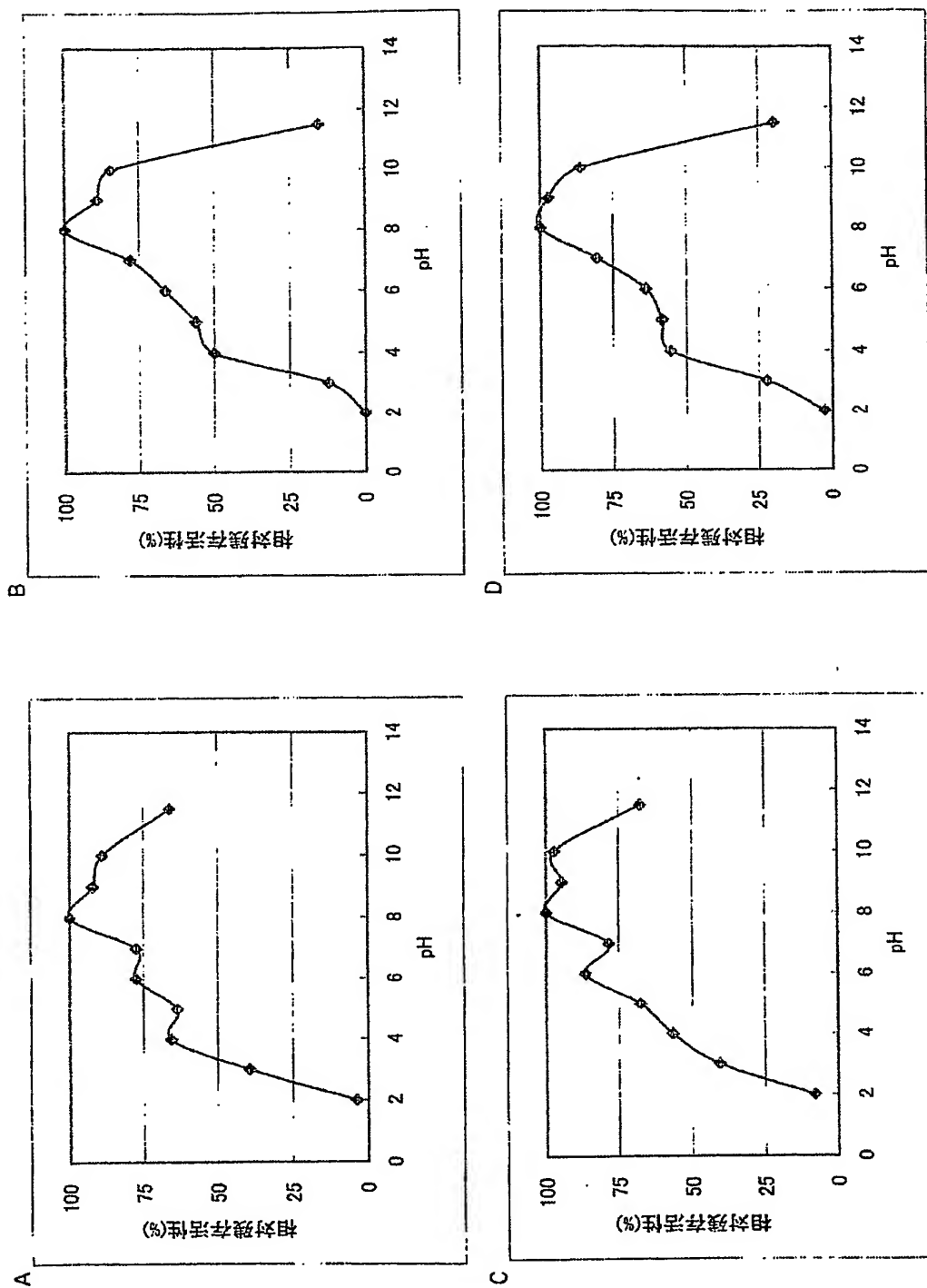
【図7】



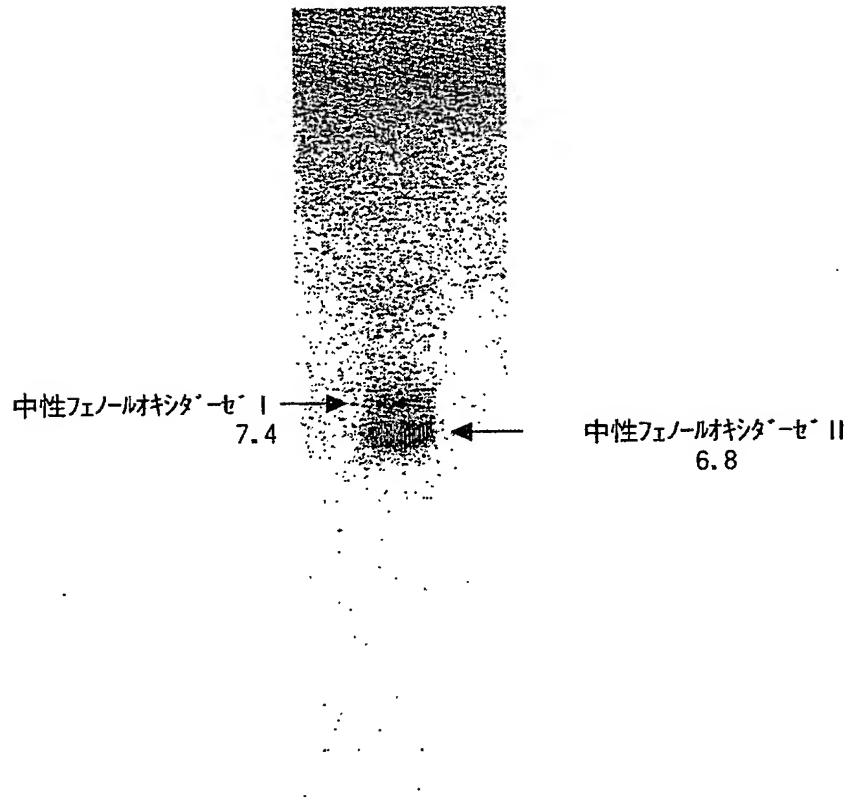
【図8】



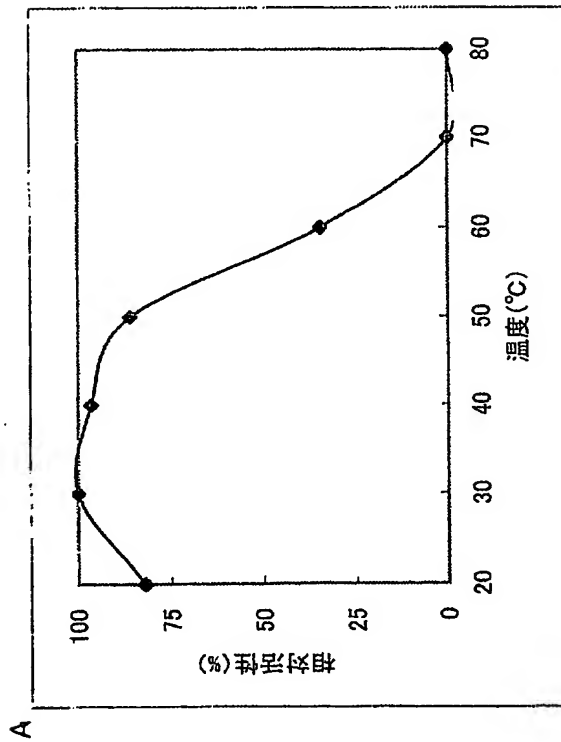
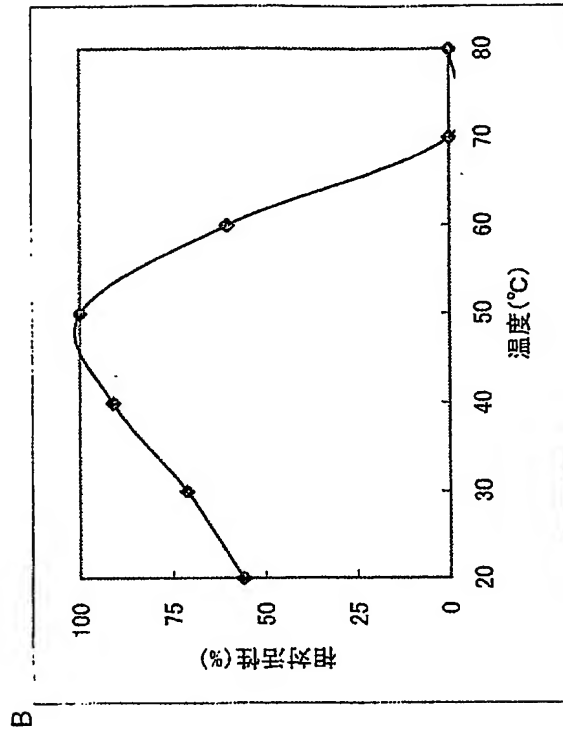
【図 9】



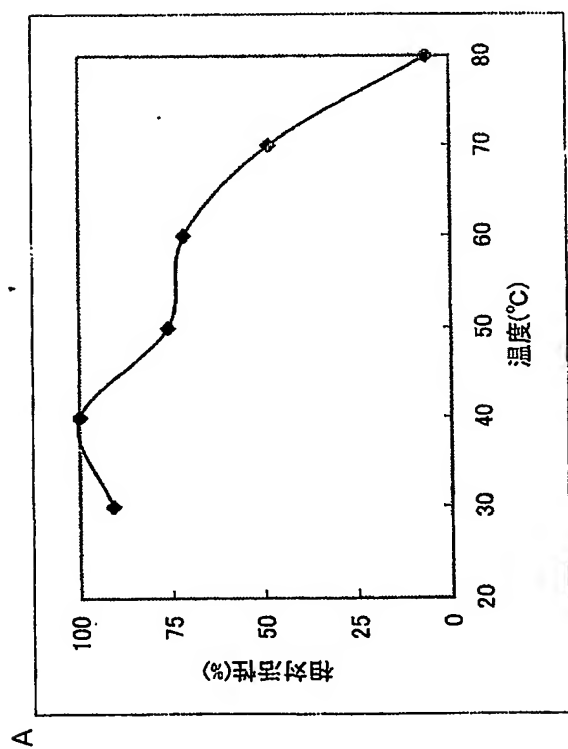
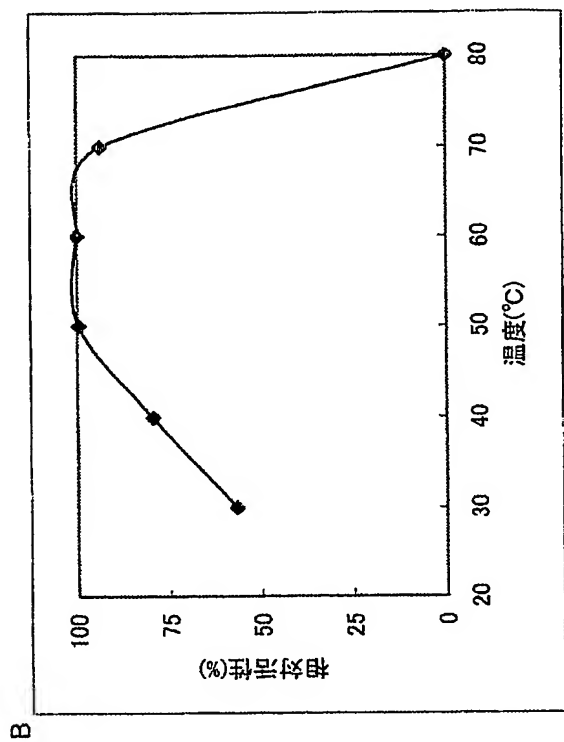
【図 10】



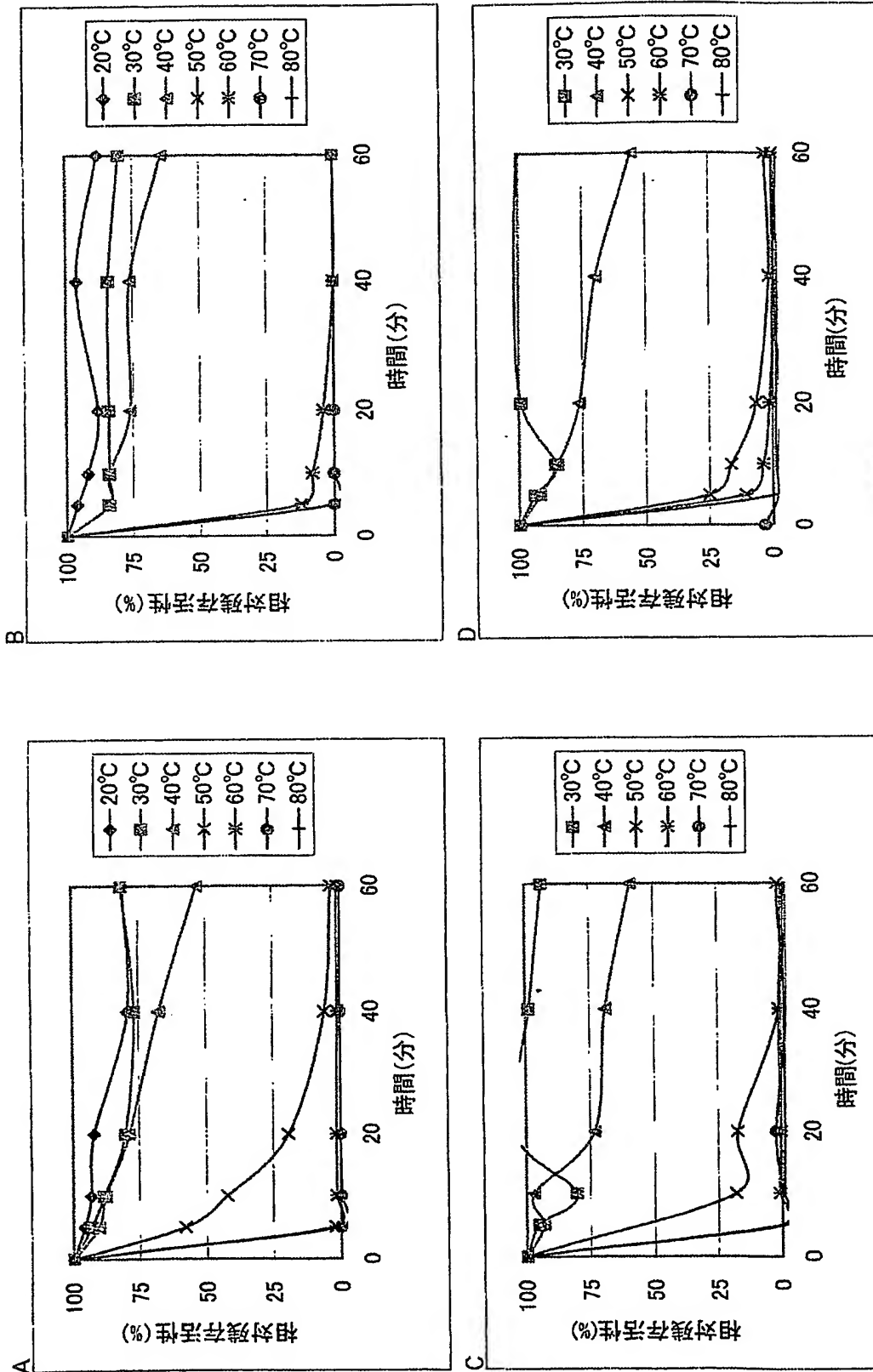
【図 11】



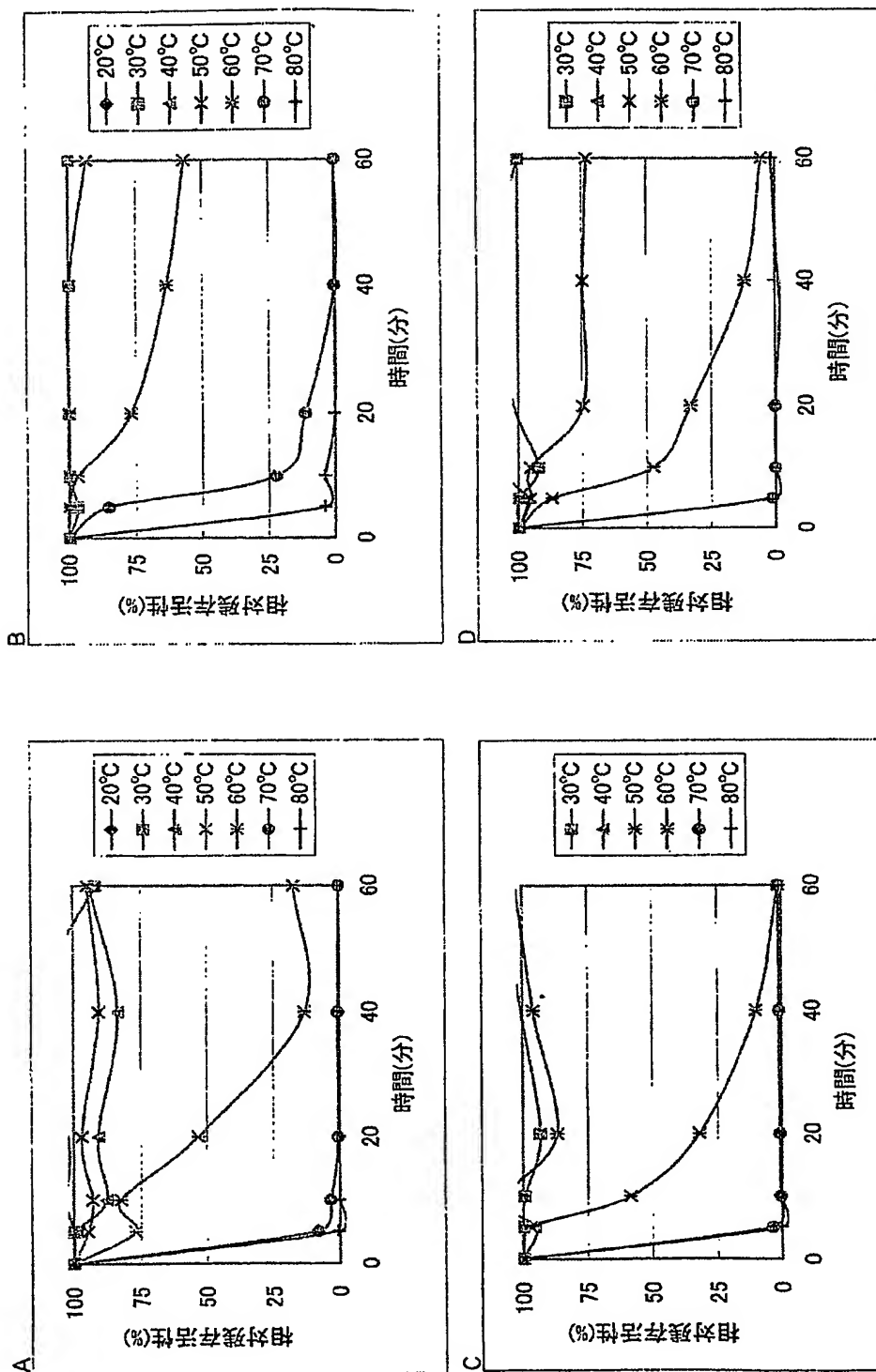
【図 12】



【図 13】



【図 14】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

繊維や毛髪の色を可能にし、さらには、環境、人体等への影響を低減させることができる手段を提供すること。

【解決手段】

分子量：約 72 kDa（ゲル濾過法）、至適 pH 5.5～7.0、下記基質特異性①N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン、オルト-アミノフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、1, 3-ジヒドロキシナフトール及び4-ヒドロキシインドールそれぞれの酸化による発色反応を pH 6.5 付近で触媒する、及び②リグニンアルカリ抽出物の酸化的重合反応を触媒する、を有する中性フェノールオキシダーゼ；フラムリナ属に属する担子菌を pH 6.0～12.0 で培養する、中性フェノールオキシダーゼの生産方法；該中性フェノールオキシダーゼに対する抗体；g a i 中性フェノールオキシダーゼを含有した染色用組成物、該性フェノールオキシダーゼの存在下に、染色対象物と染料とを接触させて、該染色対象物を染色する染色方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 6 2 4 5 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 0 0 1 1 4 4 2]

1. 変更年月日

1 9 9 3 年 3 月 1 1 日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区十二軒町 5 番 1 2 号

氏 名

株式会社マンドム